

# **Einfluss der chemischen Struktur auf die enzymatische Hydrolyse von Polyester-Nanopartikeln**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Technischen Universität Carola-Wilhemina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Katharina Welzel

aus Vechta

1. Referent:	Prof. Deckwer
2. Referent:	Prof. Klein
eingereicht am:	20.02.2003
mündliche Prüfung (Disputation) am:	07.05.2003
	2003 (Druckjahr)

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

Welzel K., Belal E., Müller R.-J., Deckwer W.-D.; „Einsatz von Nanopartikeln zur schnellen Evaluierung der biologischen Abbaubarkeit von Polyestern“ Chemie Ingenieur Technik 74 (5) 547 (2002)

Welzel K., Müller R.-J., Deckwer W.-D.; „Enzymatischer Abbau von Polyester-Nanopartikeln“ Chemie Ingenieur Technik 74 (10) 1496-1500 (2002)

### Tagungsbeiträge:

Welzel K., Marten E., Müller R.-J. „Enzymes as tools for evaluating the biodegradability of polymers“ (Poster) BIOTECHNOLOGIE 2000- The world congress on Biotechnology, 3.-8. September, Berlin (2000)

Welzel K., Marten E., Müller R.-J. „Enzymes as tools for evaluating the biodegradability of polymers“ (Poster) The second International Conference on Biopolymer Technology, 25.-27. Oktober, Ischia, Italien (2000)

Müller R.-J., Welzel K., Deckwer W.-D.; „Polymer Nano-Particles as Tools for the Evaluation of the Biodegradation of Plastics“ (Vortrag) Gordon Research Conference on Biodegradable Polymers, 8.-13. Juli, Oxford, England (2001)

Welzel K., Müller R.-J., Deckwer W.-D.; „Biodegradation of polymer nanoparticles“ (Poster) Advances in Medical and Material Science Application, 15.-16. Oktober, Cambridge, MA, USA (2001)

Welzel K., Müller R.-J., Deckwer W.-D.; „Enzymatische Katalyse an Nanopartikeln: Untersuchungen zum Mechanismus der Spaltung von Polyestern“ (Vortrag) Gemeinsame Sitzung der GVC-Fachausschüsse „Mehrfasenströmungen“ und „Technische Reaktionsführung“ und des DECHEMA-Fachausschusses „Technische Reaktionen“, 5.-7. März, Magdeburg (2002)

Welzel K., Müller R.-J., Deckwer W.-D.; „Einsatz von Nanopartikeln zur schnellen Evaluierung der biologischen Abbaubarkeit von Polyestern“ (Vortrag) GVC/DECHEMA-Jahrestagungen 2002, 11.-13. Juni, Wiesbaden (2002)



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. W.-D. Deckwer, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig, danke ich für die Themenstellung, seine Unterstützung und sein großes Interesse an der Entwicklung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Klein, Institut für Makromolekulare Chemie der TU Braunschweig, danke ich für die Übernahme des Correferates.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. R.-J. Müller. Seine Unterstützung und kritische Begleitung hat immer wieder wertvolle Anregungen für diese Arbeit gegeben.

Für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit bedanke ich mich bei Frau H. Schrader.

Herrn M. Yamamoto von der BASF AG in Ludwigshafen danke ich für die Bereitstellung einiger Polyesterproben, die AFM-Aufnahmen und für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Symbole und Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Aufgabenstellung.....	5
<b>3 Grundlagen.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Biologisch abbaubare Polymere .....</b>	<b>7</b>
3.1.1 Mechanismus des biologischen Abbaus von Polymeren .....	7
3.1.2 Kenntnisstand der Abbaumechanismen.....	9
3.1.2.1 Umweltspezifische Einflussfaktoren .....	9
3.1.2.2 Mikrobielle Einflussfaktoren.....	10
3.1.2.3 Polymerspezifische Einflussfaktoren .....	10
<b>3.2 Polyesterspaltende Enzyme .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Nanopartikel .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Nomenklatur der Polyester .....</b>	<b>18</b>
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
4.1 Chemikalien und Enzyme.....	21
4.2 Synthese der Polyester mittels Polykondensation.....	24
4.3 Charakterisierung der Polymere .....	29
4.3.1 Bestimmung der mittleren Molekulargewichte.....	29
4.3.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	29
4.4 Herstellung der Polyesterfilme .....	31
4.4.1 Filme teilkristalliner Polyester .....	31
4.4.2 Filme amorpher Polyester .....	31
4.5 Herstellung der Polyesterkugeln.....	32
4.6 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel.....	32
4.6.1 Herstellung der Nanopartikel .....	32
4.6.2 Bestimmung der Partikelgröße der Nanopartikel .....	34
4.7 Proteinbestimmung nach Lowry .....	39

---

<b>4.8</b>	<b>Enzymatischer Abbautest .....</b>	<b>39</b>
4.8.1	Messanordnung für die enzymatischen Abbautests.....	40
4.8.2	Herstellung der Enzymlösungen.....	41
4.8.3	Enzymatischer Abbau von Polymerfilmen.....	41
4.8.4	Enzymatischer Abbau von Polyesterkugeln .....	42
4.8.5	Enzymatischer Abbau der Polyester-Nanopartikeln.....	42
4.8.6	Enzymatischer Abbau von gelösten Polymeren.....	43
4.8.7	Enzymatischer Abbau von Ölen .....	43
<b>4.9</b>	<b>Berechnung der korrigierten Abbauraten .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion .....</i></b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Vorauswahl geeigneter Enzyme .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Abbau von Polyester-Nanopartikeln .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>Enzymkinetik .....</b>	<b>59</b>
<b>5.4</b>	<b>Korrelation der Abbaurrate mit der Polyesteroberfläche .....</b>	<b>72</b>
<b>5.5</b>	<b>Abbau von Nanopartikeln verschiedener Polyester .....</b>	<b>74</b>
5.5.1	Aliphatische Homopolyester .....	74
5.5.2	Aromatische Homopolyester .....	81
5.5.3	Aliphatisch-aromatische Copolyester .....	87
5.5.4	Modellvorstellung zur Kristallinität der Nanopartikel.....	96
<b>5.6</b>	<b>Abbau teilkristalliner Polyester .....</b>	<b>102</b>
<b>5.7</b>	<b>Abbau amorpher Polyester .....</b>	<b>108</b>
5.7.1	Enzymatische Hydrolyse von PHB-Nanopartikeln .....	117
5.7.2	Enzymatische Hydrolyse von PBT- und PET-Nanopartikeln .....	119
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassende Diskussion .....</i></b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b><i>Literatur .....</i></b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang.....</i></b>	<b>147</b>



## Symbole und Abkürzungen

Å	Ångström	[Å]
A	Adipinsäure	-
A	Oberfläche	[m <sup>2</sup> ]
AFM	atomic force microscopy	-
AnL	Lipase aus <i>Aspergillus niger</i>	
AoL	Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	-
AR <sub>enz</sub>	Enzymatische Abbaurrate	[μmol min <sup>-1</sup> ]
B	1,4-Butandiol	-
BASu	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Adipinsäure und Bernsteinsäure(Succinic acid)	-
BSA	Bovine serum albumin	
BTA	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure	-
BTDod	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Dodecandisäure	-
BTK	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Korksäure (Oktandisäure)	-
BTSu	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Bernsteinsäure (Succinic acid)	-
c	molare Konzentration	[mol l <sup>-1</sup> ]
CaL	Lipase aus <i>Candida antarctica</i>	-
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform	-
CcL	Lipase aus <i>Candida cylindracea</i>	-
CvL	Lipase aus <i>Chromobacterium viscosum</i>	
d	Durchmesser	[m]
D	Diethylenglykol	
Da	Dalton	[Da]
DSC	Differential Scanning Calorimetry	-
E <sub>A</sub>	Aktivierungsenergie	[kJ mol <sup>-1</sup> ]
g	Gramm	[g]
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie	-
h	Stunde	-
HFIP	Hexafluoroisopropanol	-
I	Isophthalsäure	
Kp	Siedepunkt	[°C]
m	Masse	
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel der Molmasse	[g mol <sup>-1</sup> ]
M <sub>Rep</sub>	Molmasse einer Repetiereinheit	[g mol <sup>-1</sup> ]

$M_w$	Gewichtsmittel der Molmasse	[g mol <sup>-1</sup> ]
min	Minute	-
MeOH	Methanol	-
MmL	Lipase aus <i>Mucor miehe</i>	-
n	Molzahl	[mol]
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge	-
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)	-
P	Polymerisationsgrad	
PBI	Polybutylenisophthalat	-
PBT	Polybutylenterephthalat	-
PcL	Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i>	-
PCL	Poly- $\epsilon$ -caprolacton	-
PD	Polydispersität	-
PDI	Polydiethylenisophthalat	-
PDT	Polydiethylenterephthalat	-
Pe	1,5-Pentandiol	
PET	Polyethylenterephthalat	-
PfL	Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
PHB	Polyhydroxybuttersäure	-
PPeT	Polypentylenterephthalat	
PpL	Lipase aus <i>Porcine Pancreas</i>	-
ProK	Proteinase K	-
PsL	Lipase aus <i>Pseudomonas species</i>	-
q <sub>E</sub>	adsorbierte Enzymmenge	[mg <sub>E</sub> cm <sup>-1</sup> ]
r	Radius	
RaL	Lipase aus <i>Rhizopus arrhizus</i>	
RdL	Lipase aus <i>Rhizopus delemar</i>	
REM	Rasterelektronenmikroskopie	
SP x/y	Saturated polyester (aus einer Diolkomponente mit x- und einer Dicarbonsäurekomponente mit y-Kohlenstoffatomen)	-
t	Zeit	[min]
T	Terephthalsäure	-
T <sub>g</sub>	Glastemperatur	[°C]
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur	[°C]
T <sub>Mess</sub>	Meßtemperatur	[°C]
TfH	Hydrolase aus <i>Thermomonospora fusca</i>	
UPM	Umdrehung pro Minute	[min <sup>-1</sup> ]

---

V	Volumen	
X	Umsatz	
$\varnothing$	Durchmesser	
$\rho$	Dichte	$[\text{g cm}^{-3}]$
$\rho_{\text{EB}}$	Dichte der Esterbindungen	$[\text{mol}_{\text{EB}} \text{cm}^{-3}]$
$\Theta$	Belegungsgrad einer Oberfläche	



# 1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der enzymatische Abbau von Nanopartikeln aliphatischer und aromatischer Homopolyester sowie aliphatisch-aromatischer Copolyester mit Lipasen untersucht.

Durch die Verwendung sehr feindisperser Polymerpartikel (Nanopartikel mit Durchmessern von ca. 100-200 nm) konnte die Abbaugeschwindigkeit der verwendeten Polyester teilweise drastisch gesteigert werden, sodass Abbautests in Zeiträumen von Sekunden oder einigen Minuten durchzuführen waren. Es zeigte sich jedoch, dass die Erhöhung des enzymatischen Abbaueffektes nicht nur durch die Vergrößerung der spezifischen Oberfläche hervorgerufen wurde, sondern in Abhängigkeit von den verschiedenen Polyestern, auch mit einer Veränderung der kristallinen Struktur der Nanopartikeln einhergeht.

Während die Polyester in den größer dimensionierten Probenkörpern (z.B. Filmen) alle teilkristallin waren, sind Nanopartikel aliphatischer und aromatischer Homopolyester sofort nach der Herstellung vollständig amorph. Eine Ausnahme stellte die Verbindungsklasse der teilkristallinen aliphatisch-aromatischen Copolyester dar. Die Nanopartikel dieser Polyester waren wie Polymerfilme teilkristallin. Da die biologische (enzymatische) Abbaugeschwindigkeit von Polyestern stark von der Materialstruktur (z.B. Kristallinität) abhängt, ergibt sich, dass eine direkte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Abbautests unter Verwendung von Nanopartikeln auf reale Bedingungen (z.B. Abbau von Filmen in Böden, etc.) nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Trotz der genannten Einschränkung erwies sich die Testmethode unter Einsatz von Polymer-Nanopartikeln als gut geeignet für systematische Studien zur Abbaubarkeit von Polyestern (Aufdeckung von Einflussfaktoren sowie zur Überprüfung mechanistischer Vorstellungen).

Durch vergleichende Abbauuntersuchungen an einer großen Anzahl an verschiedenen definierten Polyestern (aliphatische und aromatische Homopolyester sowie aliphatisch-aromatische Copolyester) konnte verifiziert werden, dass die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit von Polyestern in erster Linie von der Mobilität der Polymerketten bestimmt wird. Mit abnehmender Mobilität der Ketten sinken die enzymatischen Abbauraten der Polyester. Bei teilkristallinen Polyestern dominiert der Einfluss der kristallinen Domänen, wobei hier die Mobilität durch die Differenz aus Mess- und Polyesterschmelztemperatur zu beschreiben ist. Bei amorphen Polyestern war es erstmals möglich, die enzymatische Abbaugeschwindigkeit mit der Differenz aus Glas- und Messtemperatur zu korrelieren, die in solchen Systemen ebenfalls die Mobilität der Polymerketten charakterisiert.

An amorphen Nanopartikeln konnte nachgewiesen werden, dass selbst rein aromatische Polyester, die bislang in Bezug auf einen Bioabbau als vollkommen inert galten, enzymatisch

in einem Zeitraum von wenigen Stunden abbaubar sind, wenn die Bildung abbauhemmender, hochschmelzender Kristalle verhindert wird. Ebenfalls war es erstmals möglich, an einigen Polyester-Nanopartikeln (aliphatisch-aromatische Copolyester) für ein Polymer sowohl die Abbaugeschwindigkeit amorpher als auch kristalliner Bereiche unabhängig voneinander quantitativ zu bestimmen. Für einen Copolyester aus z.B. 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure zeigte sich, dass die Spaltung von Polyesterketten in amorphen Bereichen ca. 40fach schneller verläuft als in geordneten, kristallinen Domänen, in denen die Polymerketten relativ fest in den Kristallit eingebunden sind und sich nur schwer in das sterisch komplexe aktive Zentrum der Lipasen einpassen können.

Werden Polyester unter Bedingungen untersucht, bei denen eine relativ hohe Mobilität der Ketten vorliegt (Messtemperatur weit entfernt von Kristallitschmelzpunkten und Glasübergangstemperatur), lassen sich die für enzymatisch katalysierten Reaktionen üblicherweise zu beobachtenden Substratspezifitäten auch für die Hydrolyse der Polyester nachweisen. Diese Effekte sind in vielen Fällen jedoch von den deutlich stärkeren Effekten der Kettenmobilität überdeckt.

## 2 Einleitung

Seit Beginn dieses Jahrhunderts sind polymere Werkstoffe Bestandteil des täglichen Lebens. Jedes Jahr werden weltweit ca. 140 Millionen Tonnen synthetische Polymere hergestellt [SHIMAO 2001], wobei die Vielzahl und vor allem die Langlebigkeit dieser Kunststoffe ein großes Problem darstellen, denn vor allem Kunststoffe für kurzlebige Produkte wie z.B. Verpackungen oder Plastiktüten, belasten mehr und mehr die Umwelt. Vor dem Hintergrund immer knapper werdenden Deponieraumes, hoher Entsorgungskosten und der Emissionsprobleme bei der Müllverbrennung, sind neue Konzepte einer umweltverträglichen Abfallwirtschaft gefordert. Neben Abfallvermeidung und Materialrecycling könnte auch der Einsatz biologisch abbaubarer Kunststoffe einen Beitrag zur Lösung der Entsorgungsprobleme darstellen [RAFLER 1995], da sich dann alternative Verfahren zur Abfallbehandlung, wie etwa die kommunale Kompostierung, für Kunststoffabfälle öffnen. Dieser Ansatz führte im letzten Jahrzehnt zu einer intensiven Forschungstätigkeit und Entwicklung von neuartigen, biologisch abbaubaren Kunststoffen.

Als „biologisch abbaubare Kunststoffe“ werden Polymere bezeichnet, die einerseits charakteristische Eigenschaften von konventionellen Kunststoffen aufweisen (z.B. Wasserbeständigkeit, thermoplastische Verformbarkeit), aber im Gegensatz zu diesen von Mikroorganismen vollständig metabolisiert werden. Der weltweite Markt an biologisch abbaubaren Kunststoffen ist von 14 000 t (1996) auf 68 000 t (2001) angestiegen [GROSS und KALRA 2002]. Verwendung finden diese biologisch abbaubaren Kunststoffe vor allem als kurzlebige Produkte, z.B. als Lebensmittelverpackungen, Einwegmaterialien, Tragetaschen, Hygieneartikel, Folien in der Landwirtschaft und im Gartenbau, als Pflanzentöpfe oder als Müllbeutel zum Sammeln des organischen Küchenabfalls, der samt Inhalt auf dem Kompost entsorgt werden kann [JOPSKI 1993].

Entsprechend mittlerweile weitgehend allgemein akzeptierten Definitionen [DIN 54900] ist unter dem Bioabbau von Kunststoffen nicht nur der physikalische Zerfall des Materials, der zu kleineren, nicht mehr sichtbaren Fragmenten führt, zu verstehen, sondern die vollständige Metabolisierung aller niedermolekularen und hochmolekularen Komponenten zu Wasser, Kohlendioxid und anderen natürlichen Stoffwechselprodukten. Kommt es nach einem anfänglichen Polymerabbau zu Intermediaten, die von Mikroorganismen nicht weiter umgesetzt (metabolisiert) werden können, ist die Gefahr einer Akkumulation dieser Zwischenprodukte, die u.U. sogar toxische Eigenschaften aufweisen können, in der Umwelt gegeben. Um eine solche Akkumulation von Abbauprodukten zu verhindern und um insgesamt eine Umweltverträglichkeit der neuartigen bioabbaubaren Kunststoffe sicherzustellen, ist die Entwicklung und internationale Etablierung geeigneter Testverfahren zwingend erforderlich [MÜLLER 2002, AUGUSTA 1992].

Generell wird es erforderlich sein, zur Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit von Kunststoffen eine Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden heranzuziehen (Abb. 2-1).

Abb. 2-1:  
Praktische Relevanz  
und analytische  
Möglichkeiten  
verschiedener  
Testmethoden  
[MÜLLER et al. 1994].

Analytische Aussagen			Praxisnähe	
Labor-Test			Simulations-Test	Feld-Test
Enzym-Test	Clear-zone-test	STURM-Test	Erde, Wasser, Kompost	Erde, Wasser, Kompost
Ein- oder Mehrenz-System	Mikro-organismen-Reinstamm	Mikro-organismen-Mischkultur	komplexes System	komplexes System
definiertes Medium			definierte externe Bedingungen	variierende externe Bedingungen

Hierbei lassen sich die Testverfahren grundsätzlich in drei verschiedene Kategorien einteilen:

Feldversuche ermöglichen zwar den Abbau unter realen Bedingungen, die Beurteilung des Abbaus ist aber aufgrund der komplexen und undefinierten Umgebung auf eine visuelle Bewertung bzw. auf die Bestimmung von Masseverlusten des Testmaterials beschränkt. Zusätzlich sind die Umgebungsbedingungen wie Feuchte und Temperatur nicht oder nur äußerst eingeschränkt kontrollier- bzw. reproduzierbar. Um dieses Problem auszuschalten, wird in Simulationstests ein Stück Natur in das Laboratorium geholt und der Abbau unter definierten Umweltparametern, wie Temperatur und Feuchte durchgeführt. Allerdings treten bezüglich der Beurteilung des Abbaus aufgrund der Komplexität des Abbaumediums die gleichen Schwierigkeiten auf wie in Feldtests. Bei Labortests werden hingegen einzelne Mikroorganismen oder deren entsprechenden Enzymsysteme in weitgehend definierten, meist synthetischen Umgebungen (Medien) für Abbauuntersuchungen eingesetzt, was eine deutliche bessere Analyse von Intermediaten und Abbauprodukten ermöglicht. Ebenfalls bietet dieses Verfahren den Vorteil einer deutlich besseren Reproduzierbarkeit und oftmals kürzerer Testzeiten, weshalb Labortests insbesondere für systematische Untersuchungen (z.B. entwicklungsbegleitende Analytik) geeignet sind. Trotzdem bleibt die Frage offen, inwieweit Labortests, in denen nur ein bestimmtes Enzym eingesetzt wird, die Abbauprozesse in natürlichen komplexen Umgebungen repräsentieren. Für eine umfassende Bewertung der Abbaubarkeit eines Kunststoffmaterials sind deshalb in der Regel Verfahren aus den verschiedenen Kategorien zu kombinieren.



## 2.1 Aufgabenstellung

Neben den bereits erwähnten Besonderheiten der Testmethoden zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Kunststoffen, unterscheiden sich die Tests gravierend in der Zeitdauer, die sie beanspruchen. Feld- und Simulationstests (z.B. Kompostsimulationstest) benötigen mitunter bis zu 6 Monaten, bevor sie erste Ergebnisse liefern. Sowohl vom experimentellen Aufwand als auch von der Zeitdauer sind solche Tests ungeeignet, um sie begleitend zu Entwicklungen an neuen biologisch abbaubaren Kunststoffen bzw. systematischen Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus des biologischen Abbaus von Kunststoffen einzusetzen. Hier muss auf geeignete und optimierte Labortestverfahren zurückgegriffen werden.

In diesem Problemfeld setzt die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit an.

In einem ersten Schritt sollte versucht werden, ein möglichst schnelles und reproduzierbares Testsystem für Abbauuntersuchungen an Polyestern zu entwickeln. Polyester spielen auch unter praktischen Aspekten eine große Rolle innerhalb bioabbaubarer Kunststoffe.

Als Basis für das Testverfahren sollte der Abbau von Estergruppen enthaltenden Polymeren mit geeigneten Hydrolasen (Lipasen) dienen. Da es sich bei der enzymatisch katalysierten Polymerspaltung, die üblicherweise den ersten Schritt des Bioabbaus darstellt, um einen Oberflächenprozess handelt, lag die Idee nahe, durch eine drastische Vergrößerung der enzymatischen Reaktion zur Verfügung stehenden Oberfläche eine Beschleunigung des Abbaus und somit eine Verkürzung der notwendigen Messzeiten zu erreichen. Die Oberflächenvergrößerung sollte durch die Verwendung kleinster Polymerpartikel (Nanopartikel) erreicht werden.

Der zweite Schritt der Arbeiten zielt dann auf eine grundlegende Untersuchung mechanistischer Aspekte zum enzymatischen Polyesterabbau an verschiedenen Polyestern (aliphatische und aromatische Homopolyester sowie aliphatisch-aromatische Copolyester) mit Hilfe des entwickelten Testsystems. Ziel dieses Teils der Arbeit war es einerseits zu prüfen, ob aus Abbauergebnissen an solch kleinen Partikeln repräsentative und generelle Aussagen zum Polyesterabbau (auch unter praxisnahen Bedingungen) getroffen werden können. Andererseits sollte das neue Abbauverfahren genutzt werden, um detaillierte Kenntnisse zum Einfluss der unterschiedlichen Polyesterstrukturen und -parameter auf das Abbauverhalten der jeweiligen Materialien zu erlangen.



## 3 Grundlagen

### 3.1 Biologisch abbaubare Polymere

Polymere Werkstoffe wurden ursprünglich mit der Zielsetzung einer möglichst hohen Beständigkeit gegenüber Umwelteinflüssen entwickelt. Als Folge davon zielen die bislang entwickelten Testmethoden zur Kunststoffprüfung auf den Nachweis ihrer Resistenz gegenüber dem Mikroorganismenbefall. Kriterien für den Grad der „Biokorrosion“ sind z.B. die Intensität des Mikробenbewuchses auf der Kunststoffoberfläche, der Gewichtsverlust sowie die Änderungen der physikalischen Eigenschaften (Zugfestigkeit und Reißdehnung). Diese „Biokorrosionstests“ sind in der Regel für den Nachweis des biologischen Abbaus ungeeignet. Um die Umweltverträglichkeit der Kunststoffe sicherstellen zu können, war die Etablierung einer entsprechenden Definition des „Bioabbaus“ verbunden mit der Entwicklung geeigneter Testverfahren notwendig [AUGUSTA 1992].

Im folgenden ist eine Definition des „Bioabbaus“ und der „Bioabbaubarkeit“ aus der DIN 54900 (1998) zur *„Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen“* aufgeführt:

**Bioabbau:** Bioabbau eines Kunststoffes ist ein durch biologische Aktivität hervorgerufener Prozess, der über eine Veränderung der chemischen Struktur zu natürlich vorkommenden metabolischen Endprodukten führt.

**Bioabbaubar:** Ein Kunststoff wird bioabbaubar genannt, wenn alle organischen Bestandteile einem vollständigen biologischen Abbau unterliegen. Bedingungen und Abbaugeschwindigkeit werden durch Standard-Test Methoden ermittelt.

Die Definition zeigt, dass unter dem biologischen Abbau eine vollständige Metabolisierung des Kunststoffmaterials verstanden wird. Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation zielen nicht auf den gesamten Abbaumechanismus im Sinne der oben aufgeführten Definition, sondern fokussieren auf den ersten Schritt des Abbaus, der biologisch katalysierten Reduzierung der Polymermolmassen. Dieser Teilschritt wird oft als der kritische und geschwindigkeitsbestimmende Teil des Abbauprozesses nicht-wasserlöslicher Polymere angesehen.

#### 3.1.1 Mechanismus des biologischen Abbaus von Polymeren

Gemäß der Definition des „Bioabbaus“ und der „Bioabbaubarkeit“ von Kunststoffen aus der DIN V 54900 (1998) zur *„Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen“* darf der Bioabbau nicht nur in einem physikalischen Zerfall des Kunststoffes in nicht mehr sichtbare Fragmente bestehen, sondern alle hoch- und niedermolekularen Bestandteile müssen von Organismen

verdaut und so letztendlich zu Wasser, Kohlendioxid und anderen natürlichen Stoffwechselprodukten metabolisiert werden (s. Abb. 3-1).

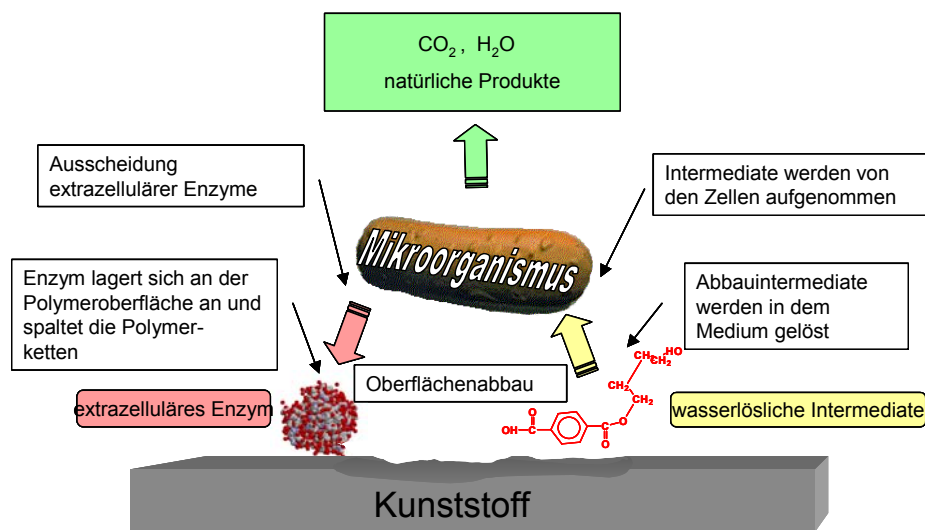


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des mikrobiellen Abbaus synthetischer Polymere

Makromoleküle können aufgrund ihrer Molekülgröße die Zellmembran von Mikroorganismen nicht passieren [SCHLEGEL 1985] und sind somit für den Mikroorganismus nicht direkt bioverfügbar. Damit Mikroorganismen derartige Substanzen als Substrate verwenden können, scheiden sie spezielle extrazelluläre Enzyme aus, die dann auf der Kunststoffoberfläche adsorbieren und die Polymerketten in wasserlösliche Bruchstücke spalten. Abhängig vom Angriffspunkt dieser Enzyme an der Polymerkette wird zwischen Exo- und Endo-Mechanismus unterschieden [KAPLAN et al. 1994]. Im Falle des Exo-Mechanismus werden Monomere oder kurzkettige Oligomere sukzessive vom Kettenende abgespalten. Beim Endo-Mechanismus hingegen erfolgt die enzymatische Spaltung ohne bevorzugte Angriffsstelle statistisch verteilt über die Polymerkette. Oftmals ist diese anfängliche enzymatische Kettenspaltung der die Abbaugeschwindigkeit bestimmende Schritt. Die abgespaltenen niedermolekularen Oligomere werden im Medium gelöst und anschließend von den Mikroorganismen aufgenommen, wo sie zu Kohlendioxid, Wasser und anderen natürlichen Produkten metabolisiert werden. Da die Enzyme aufgrund ihrer Größe nicht in den Kunststoff eindringen können, stellt der Bioabbau einen Grenzflächenprozess dar, und das Material wird von der Oberfläche her abgetragen.

### 3.1.2 Kenntnisstand der Abbaumechanismen

Der mikrobielle Abbau von Polymeren wird durch eine Reihe von Faktoren, die in Abb. 3-2 zusammengefasst sind, beeinflusst [WITT et al. 1997].

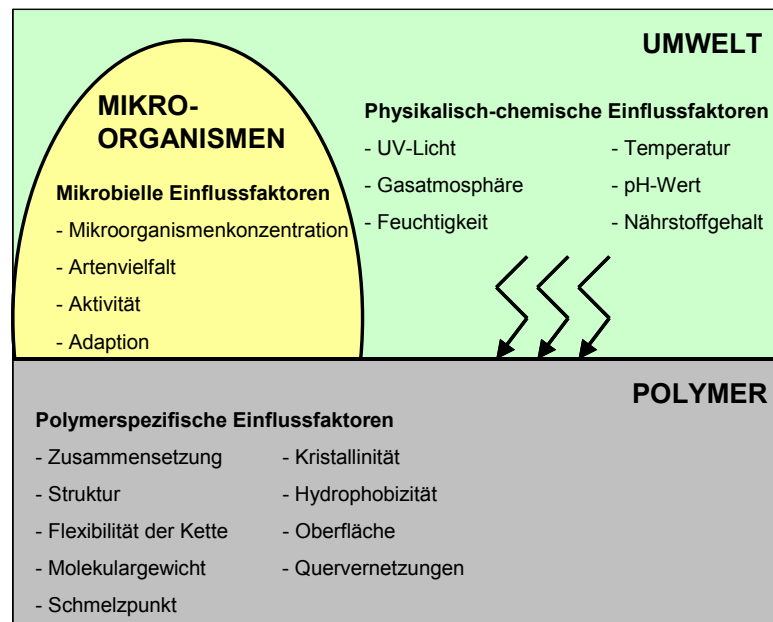


Abb. 3-2: Faktoren, die den mikrobiellen Abbau von Polymeren unter natürlichen Bedingungen beeinflussen

Abgesehen von der Vielfältigkeit dieser Faktoren, die die Komplexität dieses Systems ausmacht, sind die Parameter nicht notwendigerweise unabhängig voneinander: Wird z.B. die Struktur der Polymerkette verändert, hat dies in der Regel auch einen Einfluss auf die Schmelztemperatur oder die Kristallinität des Polymeren. In den folgenden Unterkapiteln wird dieses Schema näher erläutert.

#### 3.1.2.1 Umweltspezifische Einflussfaktoren

Die Umweltparameter, wie sie in Abb. 3-2 aufgelistet sind, wirken sich stark auf den Bioabbau von Kunststoffen aus. Durch abiotische Hydrolyse (pH-Wert, Wassergehalt) oder physikalische Disintegration (Temperatur, mechanische Zerkleinerung) kann der nachfolgende Bioabbau durch eine Vergrößerung der dem mikrobiellen Angriff zugänglichen Polymeroberfläche positiv beeinflusst werden [PALMISANO und PETTIGREW 1992, TOKIWA et al. 1988].

Der Zusatz von Oxidantien kann zu photochemischen Reaktionen (UV-Licht) und damit zur Bildung oligomerer Polymerbruchstücke führen, die dann mikrobiell weiter metabolisiert werden können. Dieses Verfahren findet Anwendung beim Abbau von Polyethylen [KAWAI

et al. 2002, ERLANDSSON et al. 1997], wo der Primärabbau der Polymerkette durch chemisch-radikalische Prozesse bewirkt wird.

Auch die Entwicklung der Mikroorganismenpopulation (ihre Artenvielfalt, Mikroorganismenkonzentration, Aktivität und Adaption) wird von umweltspezifischen Einflussgrößen bestimmt. Hier sind vor allem die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff, Wassergehalt, Temperatur, pH-Wert, Nährstoffangebot sowie Verfügbarkeit alternativer Kohlenstoffquellen zu nennen.

Die Umweltbedingungen können ebenfalls durch den mikrobiellen Abbau des Polymeren verändert werden. So können z.B. unter Umständen toxische langlebige Metabolite in der Umwelt akkumulieren und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten (Säuren) durch die Mikroorganismen den pH-Wert der Umgebung verändern.

### **3.1.2.2 Mikrobielle Einflussfaktoren**

Für den biologischen Abbau müssen zunächst geeignete Mikroorganismen vorhanden sein. In der Regel werden bestimmte Organismen nur eine spezifische Gruppe von Polymeren abbauen können, so wurden z.B. für Polyhydroxybuttersäure [JENDROSSEK 1998, MUKAI et al. 1993 a)], synthetische aliphatisch-aromatische Copolyester [KLEEBERG 1999, KLEEBERG et al. 1998] und synthetische aliphatische Homopolyester [TOKIWA und SUZUKI 1977 a)] eine Reihe von abbauenden Mikroorganismen isoliert und identifiziert.

Darüber hinaus können in unterschiedlichen Abbaumedien auch verschiedene Mikroorganismen für den Abbau verantwortlich sein. So bevorzugen z.B. Pilze feste Oberflächen für ihr Wachstum, weshalb sie bei dem Abbau in wässrigen Systemen nur schwach präsent sind. Am Abbau im Kompost hingegen sind eine Vielzahl von Pilzen an dem Abbau beteiligt.

### **3.1.2.3 Polymerspezifische Einflussfaktoren**

Generell hat sich gezeigt, dass Polymerketten, die nur aus Kohlenstoffatomen aufgebaut sind, wie z.B. Polyethylen oder Polystyrol, inert gegenüber einem biologischen Abbau sind [AMINABHAVI et al. 1990]. Eine Ausnahme bildet Polyvinylalkohol. Für dieses wasserlösliche Polymer wurde trotz seiner durchgehenden Kohlenstoffhauptkette ein biologischer Abbau nachgewiesen [SHIMAO 2001, SAKAZAWA et al. 1981]. Dabei erfolgt primär eine enzymatische Spaltung der Kohlenstoffhauptkette entweder mittels einer Dehydrogenase oder Oxidase und anschließender Hydrolase- oder Aldolase-Reaktion [MATSUMURA et al. 1999]. Ebenfalls biologisch abbaubar, obwohl nur

Kohlenstoffbindungen in der Polymerhauptkette vorhanden sind, ist Naturkautschuk (cis-1,4-Polyisopren) [ARENSKÖTTER et al. 2002]. Hier wird der primäre Schritt des Abbaus, die Spaltung des Polymerrückgrats, von einer spezifischen Dioxygenase oder Peroxidase eingeleitet.

Alle anderen abbaubaren natürlichen, wie auch synthetischen Polymere, enthalten Heterotome wie z.B. Sauerstoff oder Stickstoff in den Hauptketten, die Angriffspunkte für enzymatisch katalysierte Spaltprozesse darstellen, wobei die Hydrolysierbarkeit der Bindungen in der Polymerkette laut KAWAI (1995) in der Reihenfolge Ester > Ether > Amide > Urethane zunimmt. Für die biologische Abbaubarkeit ist demnach ausschließlich die Polymerstruktur und nicht die Herkunft der Polymere maßgeblich [WITT et al. 1999]. So sind chemisch nicht veränderte natürliche Polymere, wie z.B. Cellulose oder Stärke grundsätzlich biologisch abbaubar, aber durch chemische Modifizierungen, wie beispielsweise eine Veresterung zu Cellulosetriacetat, können Polymere entstehen, die durch Enzyme nicht mehr spaltbar sind. Auf der anderen Seite existieren eine Reihe von nachweislich biologisch abbaubaren Kunststoffen (verschiedene Polyester, Polyesteramide, Polyesterurethane), die vollständig aus Substanzen der Petrochemie hergestellt wurden.

Während die chemische Primärstruktur die grundsätzliche Abbaubarkeit von Polymeren bestimmt, wird die Geschwindigkeit des Abbaus von anderen Eigenschaften des Polymeren, wie z.B. dem Schmelzpunkt, der aber letztendlich von der Primärstruktur abhängt, kontrolliert. So wurde bereits von TOKIWA und SUZUKI (1978) beobachtet, dass ein im Vergleich zu den analogen Homopolyestern (Poly( $\epsilon$ -caprolacton und SP 6/6) niedriger schmelzender aliphatischer PCL-SP 6/6-Copolyester schneller enzymatisch hydrolysiert als die entsprechenden Homopolymere. Sie folgerten daraus, dass die Abbaugeschwindigkeit nicht nur von der chemischen Primärstruktur des Polyesters bestimmt wird, sondern auch von dessen Schmelzpunkt. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Abbaugeschwindigkeit und der Polymerschmelztemperatur wurde von WITT et al. (1995) und TOKIWA und SUZUKI (1981) vorgestellt. Sie beobachteten eine Abnahme der Abbaugeschwindigkeit aliphatisch-aromatischer Copolyester und aliphatischer Homopolyester mit zunehmender Schmelztemperatur.

Ein weiterer Faktor, der bezüglich der Abbaugeschwindigkeit von Polyestern in der Literatur diskutiert wird, ist die Kristallinität [HUANG 1985]. Verschiedene Autoren beschrieben, dass Filme aus Polyhydroxybuttersäure [CANETTI et al. 1999, NISHIDA und TOKIWA 1993, ABE et al. 1999] aus SP 4/4 [YOO und IM 1999] und aus PCL [MOCHIZUKI et al. 1995, HUANG 1985], die sich jeweils nur in ihrer Kristallinität unterschieden, mit steigender Kristallinität der Filme langsamer enzymatisch gespalten werden. SERETOUDI et al. (2002) und MONTAUDO und RIZARELLI (2000) stellten einen identischen Zusammenhang bezüglich

der Abhängigkeit der Abbaurate von Copolyestern und der Kristallinität her. Sie beobachteten eine maximale Abbaugeschwindigkeit bei Copolyestern mit minimaler Kristallinität.

Zusätzlich zur Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von der Kristallinität konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines Polymers die kristallinen Bereiche langsamer enzymatisch hydrolysiert werden als amorphe [MOCHIZUKI et al. 1995]. GAN et al. (1997) und ELDSÄTER et al. (2000) zeigten, dass die Kristallinität von PCL-Filmen während des Abbaus zunimmt. Einen analogen Effekt beobachteten KI und PARK (2001) beim Abbau von Copolymeren aus 1,4-Butandiol, 1,4-Cyclohexandimethanol, Bernsteinsäure und Terephthalsäure, wobei der Abbau ebenfalls in den amorphen Bereichen startet und sich erst anschließend in den kristallinen Domänen fortsetzt. IWATA und DOI (1999) führten diese Unterschiede auf eine unterschiedliche Mobilität der Polymerketten zurück. Anhand von enzymatischen Abbauuntersuchungen an PHB-Einkristallen konnte gezeigt werden, dass der Abbau an den Ecken des Kristalls startet, wo die Mobilität der Ketten am Größten ist. Bestätigt wurde diese Aussage durch Beobachtungen zum enzymatischen Abbau von SP 2/4-Einkristallen [IWATA et al. 2001, GAN et al. 2000].

Umfangreiche und systematische Untersuchungen zur Rolle der Kettenmobilität für den Bioabbau von Polyestern wurde von MARTEN (2000) publiziert. MARTEN (2000) stellte fest, dass für Polyester mit ähnlicher Kristallinität die Abbaugeschwindigkeit nur noch von der Mobilität der Polymerketten kontrolliert wird, wobei die Mobilität hauptsächlich durch die Differenz von Messtemperatur und Schmelzpunkt des Polymeren bestimmt wird.

Quervernetzungen in Polymeren limitieren ebenfalls die Mobilität der Polymerketten und damit die Erreichbarkeit des Polymers durch das Enzym, was gleichfalls zur Beeinträchtigung der Abbauraten führt [MARTEN 2000, WELZEL 1999, BAHARI et al. 1998, HUANG 1989].

## **3.2 Polyesterspaltende Enzyme**

Der mikrobielle Abbau von Polyestern kann in zwei Schritte unterteilt werden: der erste Schritt ist die Depolymerisierung der Polymerkette durch extrazelluläre Enzyme und der zweite die Metabolisierung der Bruchstücke. Oftmals ist die anfängliche enzymatische Kettenspaltung der die Abbaugeschwindigkeit bestimmende Schritt.

Enzyme sind allgemein Proteine, die als Biokatalysatoren wirken, indem sie durch Erniedrigen der Aktivierungsenergie die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Prozesse zu



erhöhen vermögen. Allgemein werden Enzyme nach ihren Wirkmechanismen in sechs Hauptklassen eingeteilt (s. Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Enzymklassen [LEHNINGER 1987]

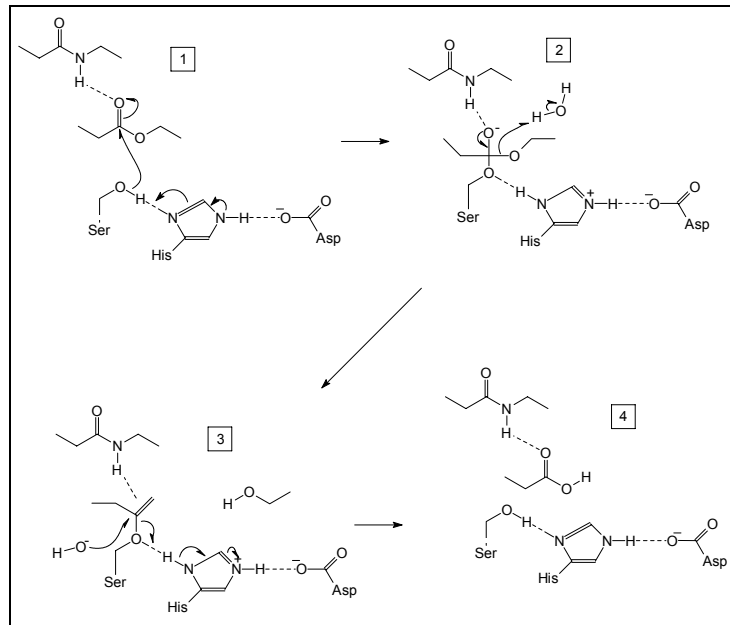
EC-Nr.	Klasse	Katalysierter Reaktionstyp
1	Oxidoreductasen	Elektronentransfer (Hydrid-Ionen oder H-Atome)
2	Transferasen	Gruppentransfer-Reaktionen
3	Hydrolasen	Hydrolytische Spaltung
4	Lyasen	Addition von Gruppen an Doppelbindungen oder Bildung von Doppelbindungen durch Entfernung von Gruppen
5	Isomerasen	Transfer von Gruppen innerhalb von Molekülen, dabei Bildung von Isomeren
6	Ligasen	Bildung von C-C-, C-S-, C-O- und C-N-Bindungen durch Kondensationsreaktionen, gekoppelt an die Hydrolyse von ATP

Die esterspaltenden Enzyme (Esterasen, Proteasen, Lipasen und PHB-Depolymerasen) gehören zu den Hydrolasen. Sie sind in der Natur weit verbreitet und kommen in Organen höherer Tiere (z.B. im Pankreas), in Pflanzensäften (z.B. dem Latex aus *Ficus*-Arten) und in verschiedenen Mikroorganismen (Bakterien, Pilze und Hefen) vor. Sie initiieren üblicherweise in der Natur den Abbau von Fetten und Ölen durch die Hydrolyse der Esterbindungen in Triglyceriden [MACRAE und HAMMOND 1985].

Aufgrund ihres Reaktionsmechanismus werden sowohl die Esterasen und Lipasen als auch die PHB-Depolymerasen zu den Serin-Hydrolasen gezählt, da das aktive Zentrum eine Serin-Protease-ähnliche katalytische Triade beinhaltet. Abb. 3-3 zeigt den Reaktionsmechanismus der enzymatischen Hydrolyse, der eine Mischung aus kovalenter Katalyse und Säure-Base-Katalyse darstellt.

Abb. 3-3:

Reaktionsmechanismus  
der enzymatischen  
Hydrolyse mittels einer  
Serin-Hydrolase  
[JÄGER et al. 1994]

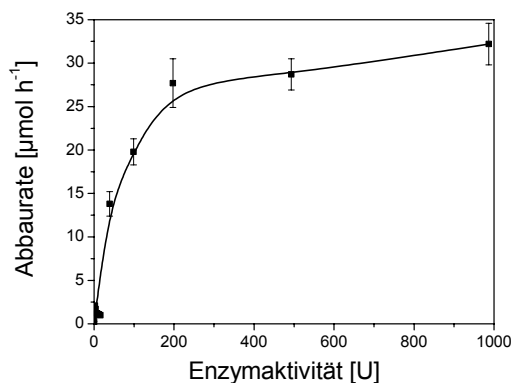


Zunächst wird die OH-Gruppe des Serins durch das benachbarte Histidin polarisiert und greift dann im ersten Schritt der Katalyse die Carbonylgruppe des zu spaltenden Esters nukleophil an, wobei ein tetraedrischer Übergangszustand entsteht. Das negativ geladene Aspartat stabilisiert die positive Ladung, die sich am Histidin-Rest bildet. Infolge des Angriffs des Serin-Sauerstoffs auf die Carbonylgruppe bildet sich ein sehr kurzlebiges Zwischenprodukt mit einem negativ geladenen Carbonyl-Sauerstoffatom (Oxyanion), welches durch die NH-Gruppen des Peptidgerüsts stabilisiert wird (kovalente Katalyse). Der Imidazolring des Histidins nimmt das abgespaltene Proton des Serins unter Bildung eines Imidazolium-Ions auf (Säure-Basen-Katalyse). In der nächsten Teilreaktion zerfällt der tetraedrische Übergangszustand unter Deprotonierung des Histidin-Stickstoffs in das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt. Der Alkohol des Spaltstückes löst sich vom Enzym ab und an seiner Stelle tritt Wasser aus dem Lösungsmittel ein. Der letzte Schritt der Spaltung ist eine Decarboxylierung. Bei diesem Prozess ist Wasser das angreifende Nukleophil und das Serin die austretende Gruppe [VOET und VOET 1992].

Trotz des gleichen Katalysemechanismus benötigen Lipasen und PHB-Depolymerasen im Gegensatz zu Esterasen eine hydrophobe Oberfläche, um aktiv zu sein. Diese Grenzflächen- oder Interphasenaktivierung wird bei Lipasen auf eine strukturelle Ursache, das Vorhandensein eines sogenannten „Deckels“, der das katalytische Zentrum verdeckt, zurückgeführt. Nach SCHMID und VERGER (1998) wird dieser Deckel durch Konformationsänderungen geöffnet und somit die katalytische Triade für das Substrat zugänglich. Esterasen verfügen nicht über diesen sogenannten „Deckel“.

Für PHB-Depolymerasen wurde keine Abschirmung des aktiven Zentrums durch einen „Deckel“, sondern eine räumliche Trennung einer hydrophoben Bindungsstelle und des katalytischen Zentrums postuliert [MUKAI et al. 1993 b)]. Ausgangspunkt für dieses Modell sind Beobachtungen über die Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von PHB von der Enzymkonzentration. In Abb. 3-4 sind die Abhängigkeiten der Abbauraten von Polyestern von der Enzymkonzentration a) für Lipasen und b) für PHB-Depolymerasen dargestellt.

a) Lipase



b) PHB-Depolymerase

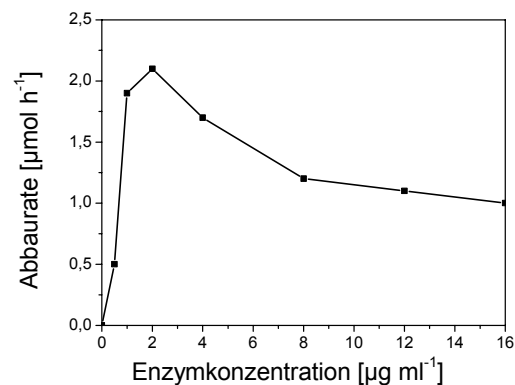


Abb. 3-4: Einfluss der Konzentration a) der Lipase aus *Rhizopus delemar* auf die Abbaugeschwindigkeit von SP 3/4-Filmen [WALTER et al. 1995] und b) der PHB-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* auf die Abbaugeschwindigkeit von PHB-Filmen [MUKAI et al. 1993 b)]

Die Plateauphase, die bei vielen Lipasen beobachtet werden kann, ist durch eine Sättigung der verfügbaren Polyester Oberfläche durch die Enzyme bedingt. In diesem Bereich tritt keine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Enzymkonzentration auf. Im Gegensatz dazu wird beim Abbau mit PHB-Depolymerasen eine Abnahme der Abbaurate bei hohen Enzymkonzentrationen festgestellt. Zur Klärung der beobachteten Abnahme der Abbaurate wurde von MUKAI et al. (1993 b) folgendes Modell vorgestellt (s. Abb. 3-5).

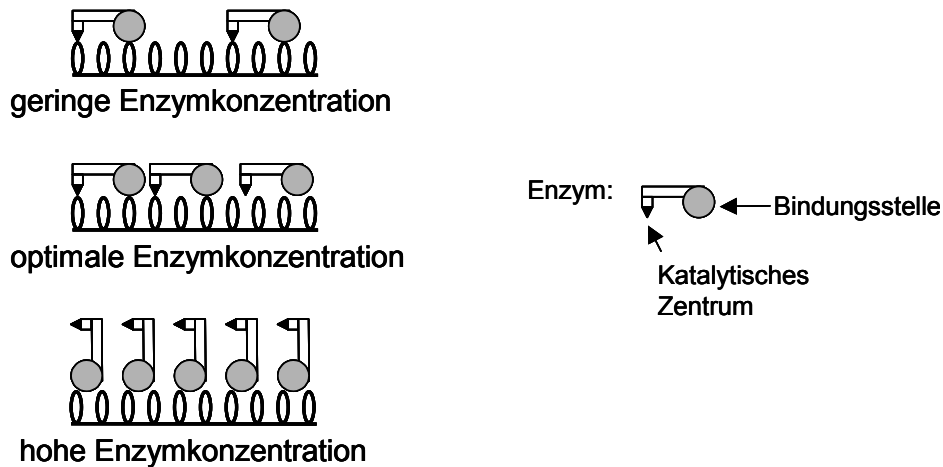


Abb. 3-5: Schematisches Modell des enzymatischen Abbaus an der PHB-Oberfläche bei verschiedenen Enzymkonzentrationen [MUKAI et al. 1993 b)].

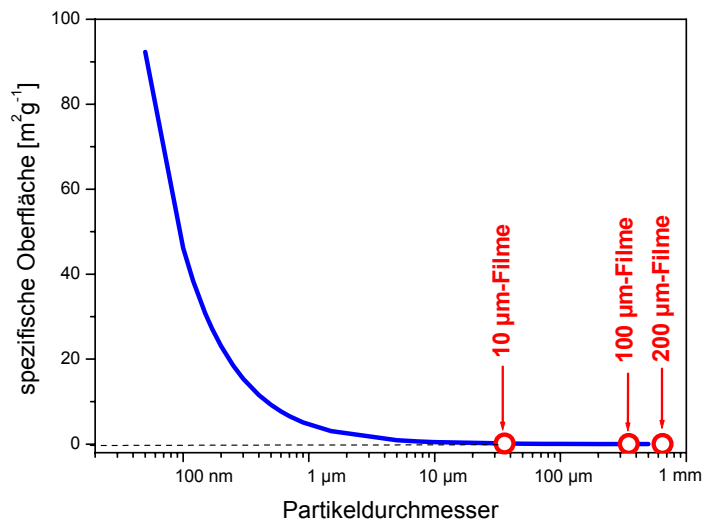
Oberhalb der optimalen Enzymkonzentration ist die Belegung der Oberfläche mit gebundenen Enzymen so stark, dass sich die Enzyme so anordnen, dass ihr katalytisches Zentrum nicht mehr die Polyesteroberfläche erreicht, was sich durch eine Reduzierung der Abbaurate bemerkbar macht.

### 3.3 Nanopartikel

Der biologische Abbau von Polymeren stellt sich als Oberflächenprozess dar. Durch eine Vergrößerung der verfügbaren Polymeroberfläche kann auch dessen Abbaugeschwindigkeit gesteigert werden [WALTER et al. 1995]. Es stellt sich nun die Frage, wie die zugängliche Oberfläche des Polymeren erhöht werden kann. Zum einen ist es prinzipiell möglich, die Kunststoffmenge in einem bestimmten Experiment zu erhöhen, was aber unter praktischen Gesichtspunkten und im Hinblick auf die in der Aufgabenstellung geforderte Entwicklung eines sogenannten „Schnelltests zur Prüfung der prinzipiellen Abbaubarkeit von Kunststoffen“, nicht sinnvoll erscheint. Zum anderen kann durch eine Verkleinerung des Partikeldurchmessers die spezifische Oberfläche drastisch erhöht werden (s. Abb. 3-6).

Abb. 3-6:

Zusammenhang zwischen  
der spezifischen Oberfläche  
und dem  
Partikeldurchmesser



Aus Abb. 3-6 geht deutlich hervor, dass es eine gravierende Steigerung der spezifischen Oberfläche erst ab einem Partikeldurchmesser kleiner als 1 µm zu erkennen ist. Für eine signifikante Steigerung der spezifischen Oberfläche ist folglich der Einsatz von Partikeln mit einem Durchmesser im Nanometerbereich notwendig.

Durch das große Oberflächen/Volumenverhältnis treten spezifische physikalische und chemische Eigenschaften der Oberfläche bei Nanopartikeln in den Vordergrund, was dazu führt, dass sich einige physikalische und chemische Eigenschaften dieser Partikel von denen der grobkörnigeren Pendanten unterscheiden [RÖSSLER et al. 2001]. Dieser sogenannte Oberflächeneffekt beruht darauf, dass sich Atome an der Oberfläche in einem erhöhten energetischen Zustand befinden als die Atome im Innern des Materials, da sie über eine geringere Zahl nächster Nachbarn verfügen, mit denen sie in Wechselwirkung stehen.

In der Pharmazie finden Nanopartikel als Wirkstoffträger schon seit längerem eine Anwendung. Vorteile der Verwendung von Nanopartikeln sind [BRANNON-PEPPAS 1995]:

- Kontrollierte und gleichmäßige Medikamentenfreisetzung
- Freisetzung an dem gewünschten Ort
- Keine lokale Überdosierung
- Verringerung der Darreichungsfrequenz
- Gutes Transportsystem, um Medikamente intraartikulär einzusetzen, da sie aufgrund ihrer Größe Zellwände passieren können.
- Sie können zur intravenösen Injektion eingesetzt werden
- Abbau des Materials, keine Nachoperation zur Entfernung notwendig

Besonderen Einsatz finden Nanopartikel aus Poly( $\epsilon$ -caprolacton) und Polymilchsäure, da diese Materialien eine gute biologische Verträglichkeit aufweisen. Sie werden in nicht-toxische und durch den Organismus vollständig metabolisierbare Endprodukte abgebaut [ANDERSON und SHIVE 1997]. Einen guten Überblick über Anwendungen von Polyester-Nanopartikeln in der Pharmazie geben SOPPIMATH et al. (2001).

Während beim Abbau von Polyestern *in vivo* hauptsächlich rein hydrolytische Abbaumechanismen bestimmend sind, wird im Rahmen dieser Arbeit die enzymatisch katalysierte Spaltung der Polyester-Nanopartikel untersucht.

Erste Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Polyester-Nanopartikeln wurden von WU und GAN (1998) und GAN et al. (1999 a) publiziert. Sie konnten mittels Lichtstreuungsmessungen deutlich zeigen, dass Nanopartikel aus Poly( $\epsilon$ -caprolacton) schneller enzymatisch hydrolysiert wurden als Filme des gleichen Polyesters. Der enzymatische Abbau des Polyesters konnte durch die Vergrößerung der verfügbaren Polyesteroberfläche um den Faktor  $10^3$  beschleunigt werden.

### 3.4 Nomenklatur der Polyester

Die Nomenklatur der hier verwendeten linearen aliphatischen Copolyester erfolgt nach der Vorschrift des Deutschen Instituts für Normung DIN 7728. Demnach wird bei gesättigten Polyestern erst die Anzahl der Kohlenstoffatome des Diols und dann die Anzahl der Kohlenstoffatome der Dicarbonsäure als Zahlenwert hinter das Kurzzeichen SP (saturated polyester) gesetzt (s. Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Beispiele für die Nomenklatur gesättigter linearer aliphatischer Homopolyester

Monomere (Diol, Dicarbonsäure)	strukturbezogener Name (IUPAC <sup>a)</sup> )	Kurzzeichen (DIN 7728)
1,3-Propandiol, Bernsteinsäure	Poly-(trimethylensuccinat)	SP 3/4
1,4-Butanediol, Adipinsäure	Poly-(tetramethylenadipat)	SP 4/6
1,5-Pentandiol, Adipinsäure	Poly-(pentamethylenadipat)	SP 5/6

<sup>a)</sup> IUPAC = International Union of Pure and Appplied Chemistry

In dieser Arbeit werden anstelle der strukturbezogenen IUPAC-Namen der aliphatisch-aromatischen Copolyester ebenfalls Kurzzeichen verwendet. Dazu werden die Anfangsbuchstaben der im Copolyester verwendeten Monomere eingesetzt (erster Buchstabe Diol, zweiter Buchstabe aromatische Dicarbonsäure, dritter Buchstabe aliphatische Dicarbonsäure). Beispiele für die Nomenklatur sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Tabelle 3-3: Beispiele für die Nomenklatur aliphatisch-aromatischer Copolyester

Monomere (Diol /aromatische Dicarbonsäure/ aliphatische Dicarbonsäure)	strukturbezogener Name (IUPAC)	Kurzzeichen
1,3-Propandiol, Terephthalsäure, Bernsteinsäure	Poly-[trimethylensuccinat)-co- (trimethylenterephthalat)]	PrTSu
1,4-Butandiol, Terephthalsäure, Adipinsäure	Poly-[tetramethylenadipat)-co- (tetramethylenterephthalat)]	BTA
1,4-Butandiol, Isophthalsäure, Adipinsäure	Poly-[tetramethylenadipat)-co- (tetramethylenisophthalat)]	BIA

Die stöchiometrischen Anteile (in mol%) der beiden Dicarbonsäuren werden in der Reihenfolge aromatische, aliphatische Säure hinter der Buchstabenfolge getrennt durch einen Doppelpunkt angeben. So wird z.B. ein Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure (40 mol%) und Adipinsäure (60 mol%) als BTA 40:60 bezeichnet.





## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Enzyme

#### Verwendete Chemikalien:

Tabelle 4-1: Charakteristische Daten der verwendeten Chemikalien

	Bezugs- quelle	Reinheit <sup>a)</sup>	Siede- bzw. Schmelzpunkt	Molmasse
Aceton	Fluka	≥ 99,8%	Kp=56°C	58,08 g mol <sup>-1</sup>
Azelainsäure	Fluka	>99%	T <sub>m</sub> =103-106°C	188,23 g mol <sup>-1</sup>
Adipinsäuredimethylester	Fluka	99 %	T <sub>m</sub> =9-11°C	174,20 g mol <sup>-1</sup>
Bernsteinsäuredimethylester	Fluka	98 %	T <sub>m</sub> =16-19°C Kp=190-193°C	146,14 g mol <sup>-1</sup>
1,4-Butandiol	Fluka	99,5 %	T <sub>m</sub> =19-20°C Kp=120-122°C	90,12 g mol <sup>-1</sup>
Chloroform	Baker	99 %	Kp=61°C	119,38 g mol <sup>-1</sup>
Chloroform (HPLC grade)	Fluka	99,8%	Kp=61°C	119,38 g mol <sup>-1</sup>
Diethylenglykol	Merck	>99%	T <sub>m</sub> =-6°C Kp=245°C	106,12 g mol <sup>-1</sup>
Dodecandisäuredimethylester	Aldrich	98%	T <sub>m</sub> =15°C	226,4 g mol <sup>-1</sup>
Glycerin	Merck	87%	k. A. <sup>b)</sup>	k. A. <sup>b)</sup>
Gummi arabicum	Sigma	k. A. <sup>b)</sup>	k. A. <sup>b)</sup>	~250000 g mol <sup>-1</sup>
Hexafluoroisopropanol	Fluka	≥99%	Kp=57-60°C	168,04 g mol <sup>-1</sup>
1,6-Hexandiol	Aldrich	98%	T <sub>m</sub> =41-43°C	118,18 g mol <sup>-1</sup>
Isophthalsäuredimethylester	Fluka	≥98%	T <sub>m</sub> =64-68°C	194,19 g mol <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel de Häen	>99,5%	k. A. <sup>b)</sup>	136,09 g mol <sup>-1</sup>
Korksäuredimethylester	Fluka	≥99%	Kp=110	230,30 g mol <sup>-1</sup>
Natriumchlorid	Merck	≥99,5%	T <sub>m</sub> =801°C	58,44 g mol <sup>-1</sup>
Methanol, tech.	-	k. A. <sup>b)</sup>	Kp=64°C	32,04 g mol <sup>-1</sup>
1,5-Pentandiol	Fluka	~97%	Kp=241-243°C	104,15 g mol <sup>-1</sup>

Fortsetzung von Tabelle 4-1

	Bezugs- quelle	Reinheit <sup>a)</sup>	Siede- bzw. Schmelzpunkt	Molmasse
Pimelinsäure	Fluka	≥99%	T <sub>m</sub> =64-68°C	160,17 g mol <sup>-1</sup>
Polybutylenterephthalat	BASF	k. A. <sup>b)</sup>	T <sub>m</sub> =227°C	45000 g mol <sup>-1</sup>
Poly-ε-caprolacton	Poly- sciences	k. A. <sup>b)</sup>	T <sub>m</sub> =60°C	50000 g mol <sup>-1</sup>
Polyethylenterephthalat	BASF	k. A. <sup>b)</sup>	T <sub>m</sub> =260°C	k. A. <sup>b)</sup>
Polyhydroxybuttersäure	ICI	k. A. <sup>b)</sup>	T <sub>m</sub> =180°C	540000 g mol <sup>-1</sup>
1,3-Propandiol	Riedel de Häen	>99,5%	Kp=227-229°C	90,12 g mol <sup>-1</sup>
Sebacinsäuredimethylester	Fluka	>97%	T <sub>m</sub> =25-28°C	230,31 g mol <sup>-1</sup>
Terephthalsäuredimethylester	Fluka	99 %	T <sub>m</sub> =140-142°C	194,19 g mol <sup>-1</sup>
Tetrahydrofuran	Merck	99,7 %	Kp=66°C	72,11 g mol <sup>-1</sup>
Tetraisopropylorthotitanat	Fluka	95 %	Kp <sub>10</sub> =104°C	284,29 g mol <sup>-1</sup>
Toluol	Riedel	>99,7%	Kp=109-112°C	92,14 g mol <sup>-1</sup>
Triacetin	Sigma	99%	Kp=258-260°C	218,2 g mol <sup>-1</sup>
Tridecandisäure	Aldrich	98%	T <sub>m</sub> =112-114°C	244,33 g mol <sup>-1</sup>
Triolein	Fluka	≥97%	Kp=235-240°C	885,46 g mol <sup>-1</sup>
Triphenylphosphat	Fluka	98 %	Kp=245°C	326,29 g mol <sup>-1</sup>

<sup>a)</sup> Reinheit nach Herstellerangaben<sup>b)</sup> k. A.: keine Angaben des Herstellers

**Enzyme:**

Tabelle 4-2: Übersicht über die verwendeten Hydrolasen

Enzym	Bezugs- quelle	Ursprung	Protein- gehalt der Feststoffe <sup>a)</sup> [%]	Aktivität <sup>b)</sup> [U mg <sup>-1</sup> ]	Molekular- gewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	Temperatur Optimum [°C]
Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i> (AoL)	Fluka	Pilz	60	3,4	35000 <sup>c)</sup> 29000 <sup>d)</sup>	30
Lipase aus <i>Candida antartica</i> (CaL)	Fluka	Hefe	40	0,3	49000 <sup>c)</sup>	>60
Lipase aus <i>Candida</i> <i>cylindracea</i> (CcL) (= <i>Candida rugosa</i> )	Fluka	Hefe	40	20,9	60000 <sup>c)</sup> 60000 <sup>e)</sup> 67000 <sup>f)</sup>	45
Lipase aus <i>Mucor</i> <i>miehei</i> (MmL)	Fluka	Pilz	90	2,2	37000 <sup>c)</sup>	40
Lipase aus <i>Porcine</i> <i>pancreas</i> (PpL)	Sigma	Säugetier	25	3,6	59000 <sup>c)</sup> 74000 <sup>g)</sup>	35
Lipase aus <i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i> (PcL)	Fluka	Bakterium	10	60,0	34000 <sup>h)</sup>	40-65
Lipase aus <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> (PfL)	Fluka	Bakterium	100	366,9	32000 <sup>c)</sup> 33000 <sup>i)</sup>	55
Lipase aus <i>Pseudomonas</i> <i>species</i> (PsL)	Sigma	Bakterium	50	192,1	29000 <sup>c)</sup> 29000 <sup>j)</sup>	50
Hydrolase aus <i>Thermomonospora</i> <i>Fusca</i> (TfH)	GBF	Actinomycet	5	5 <sup>k)</sup>	27440 <sup>l)</sup>	60
Proteinase K	Sigma	Pilz	100	0,5	32000 <sup>c)</sup>	45

<sup>a)</sup> Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) (s. Kapitel 4.7)

<sup>b)</sup> 1 Unit produziert 1 µmol Ölsäure aus Triolein/Triacetin pro Minute bei 40°C und pH 7,0 (s. Kapitel 4.8)

<sup>c)</sup> bestimmt mittels SDS-Gelen, stärkste Bande wurde als Lipaseprotein angenommen

<sup>d)</sup> [TOIDA et al. 1998]

<sup>e)</sup> [CYGLER und SCHRAG 1999]

<sup>f)</sup> Herstellerangaben (Fluka)

<sup>g)</sup> [RUDD et al. 1987]

<sup>h)</sup> [BORNSCHEUER et al. 1999]

<sup>i)</sup> [KOJIMA et al. 1994]

<sup>j)</sup> [IHARA et al. 1991]

<sup>k)</sup> 1 Unit produziert 1 µmol Säure aus PCL-Filmen (Ø=0,9 cm) pro Minute bei 55°C und pH 7,0

<sup>l)</sup> [KLEEBERG 2000]

Zur Bestimmung der Reinheit der Enzymformulierungen und zur Bestimmung der Molekulargewichte der Enzyme wurden SDS-Gelelektrophoresen mit 8-18 Gradient ExcelGelen SDS, (Pharmacia Biotech, Freiburg) auf einem Multipor II Gelelektrophorese-System (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend den Herstellerangaben (Instructions, 80-1310-00 Edition AE, Pharmacia Biotech, Freiburg) mit „nicht reduzierendem Probenpuffer A“ vorbehandelt. Auf dem Gel liegende Filterplättchen wurden mit je 15 µl Probe (Proteinkonzentration 5-50 µg/ml) getränkt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 15°C, 600 V, 50 mA und 30 W über 75 min. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung mit dem „Silver Staining Kit“ (Code No. 17-1150-01, Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert. Ausgewählte Chromatogramme sind in Abb. 4-1 dargestellt.

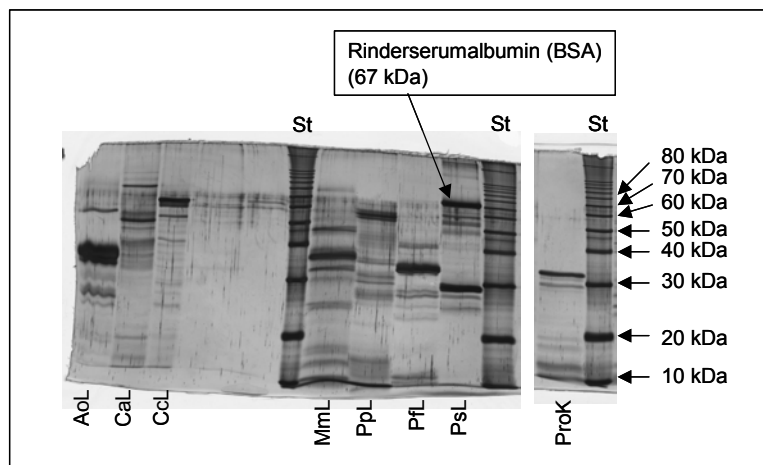


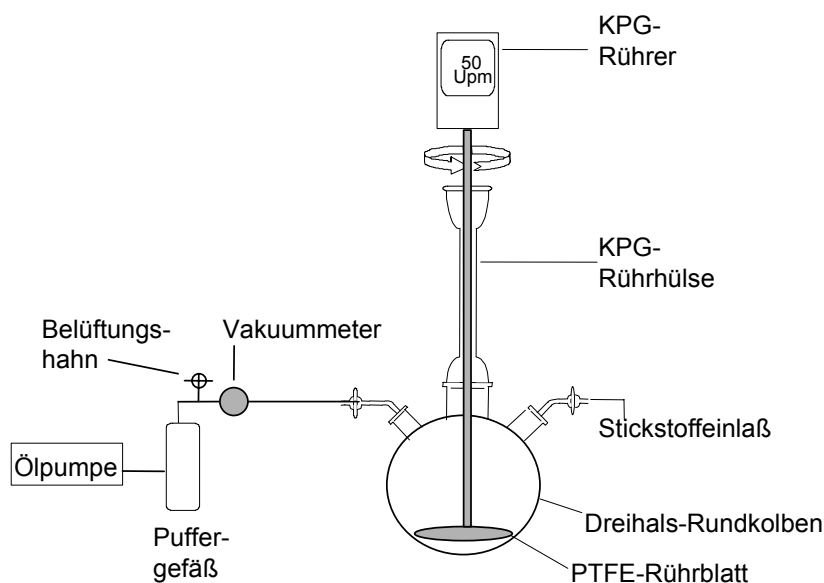
Abb. 4-1: SDS-Gel zur Bestimmung der Reinheit und der Molekulargewichte der Enzyme (Angaben der Molekulargewichte in kDa; St: Proteinstandard AoL: Lipase aus *Aspergillus oryzae*, CaL: Lipase aus *Candida antarctica*, CcL: Lipase aus *Candida cylindracea*, MmL: Lipase aus *Mucor miehei*, PpL: Lipase aus *Porcine pancreas*, Pfl: Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, PcL: Lipase aus *Pseudomonas cepacia*, PsL: Lipase aus *Pseudomonas species*, ProK: Proteinase K).

## 4.2 Synthese der Polyester mittels Polykondensation

Die Synthese der Polyester erfolgte mittels Polykondensation in der Schmelze. Dieses Verfahren wird besonders zur Herstellung von Polyestern und Polyamiden eingesetzt [Vollmert 1998]. Die Schmelzkondensation erfolgte in der in Abb. 4-2 dargestellten Apparatur.

Abb. 4-2:

Apparatur zur  
Polyestersynthese  
mittels Schmelz-  
kondensation.



Der Dicarbonsäuredimethylester (0,20 mol) und ein 5%iger Überschuss an Diol (0,21 mol) wurden in Gegenwart von Umesterungskatalysatoren (Triphenylphosphat und Tetraisopropylorthotitanat) im Stickstoffgegenstrom vorgelegt, wobei die Masse an Umesterungskatalysator 0,025 Gewichts-% der zu erwartenden Polyester Menge betrug. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren ( $50 \text{ U min}^{-1}$ ) graduell innerhalb von 4 Stunden langsam auf  $140^\circ\text{C}$  bis  $150^\circ\text{C}$  aufgeheizt, wobei die Endtemperatur oberhalb der Schmelzpunkte der einzelnen Edukte und auch der Produkte lag. Der entstehende Alkohol (Methanol) wurde während der gesamten Reaktion kontinuierlich aus dem Reaktionsgemisch durch Destillation entfernt. Anschließend wurde der Druck erst mittels einer Membranpumpe langsam auf 20 mbar herabgesetzt, und dann mit Hilfe einer Ölpumpe ein Hochvakuum (0,01 mbar) angelegt. Die Gesamtkondensationszeit betrug ca. 72 h, wonach der Polyester unter Vakuum abgekühlt wurde.

Um die Katalysatoren, eventuell entstandene Nebenprodukte, nicht umgesetzte Monomere und Oligomere abzutrennen, ist eine Aufreinigung der Polyester notwendig. Diese Aufreinigung erfolgte durch Lösungsfällung. Hierzu wurden die jeweiligen Polyester in Chloroform gelöst (50 g Polyester pro 100 ml Chloroform) und anschließend unter starkem Rühren (KPG-Rührer,  $700 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) in die 10-fache Menge eisgekühltes Methanol getropft. Der Niederschlag wurde abgefiltert, mehrmals mit Methanol gewaschen und bei  $30^\circ\text{C}$  im Vakuum Trockenschrank ( $<0,1 \text{ mbar}$ ) 24 Stunden getrocknet.

Die charakteristischen Daten der Polyester, wie die mittleren Molekulargewichte, Schmelztemperaturen, Schmelzenthalpie und Glasübergangstemperaturen, sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 4-3 bis Tabelle 4-6) zusammengefasst.

Tabelle 4-3: GPC- und DSC-Messdaten der aliphatischen Homopolyester

Polyester	Monomere		$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g mol <sup>-1</sup> ]	PD	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J g <sup>-1</sup> ]	$T_g$ [°C]
	Diol	Dicarbonsäure						
SP 3/4	1,3-Propandiol	Bernsteinsäure	12800	5900	2,2	47	48	-31
SP 3/6	1,3-Propandiol	Adipinsäure	20800	11000	1,9	42	53	n.b. <sup>a)</sup>
SP 3/9	1,3-Propandiol	Azelainsäure	21700	12000	1,8	56	64	n.b. <sup>a)</sup>
SP 3/10	1,3-Propandiol	Decandisäure	15400	7800	2,0	55	67	n.b. <sup>a)</sup>
SP 3/12	1,3-Propandiol	Dodecandisäure	16200	7200	2,2	65	93	n.b. <sup>a)</sup>
SP 3/13	1,3-Propandiol	Tridecandisäure	23000	9800	2,3	73	81	n.b. <sup>a)</sup>
SP 4/4	1,4-Butandiol	Bernsteinsäure	41000	23500	1,7	114	72	-35 <sup>b)</sup>
SP 4/6	1,4-Butandiol	Adipinsäure	54500	26600	2,0	56	66	-56
SP 4/8	1,4-Butandiol	Korksäure	39700	19600	2,0	60	80	n.b. <sup>a)</sup>
SP 4/10	1,4-Butandiol	Sebacinsäure	52200	23400	2,3	66	89	n.b. <sup>a)</sup>
SP 4/12	1,4-Butandiol	Dodecandisäure	33700	21700	1,6	73	90	n.b. <sup>a)</sup>
SP 5/6	1,5-Pentandiol	Adipinsäure	40400	21700	1,9	42	60	n.b. <sup>a)</sup>
SP 5/7	1,5-Pentandiol	Pimelinsäure	37600	15000	2,5	42	69	n.b. <sup>a)</sup>
SP 6/4	1,6-Hexandiol	Bernsteinsäure	19700	8600	2,2	51	77	n.b. <sup>a)</sup>
SP 6/6	1,6-Hexandiol	Adipinsäure	28000	12400	2,3	58	89	n.b. <sup>a)</sup>
PDA	Diethylenglykol	Adipinsäure	51200	17100	2,9	-- <sup>c)</sup>	-- <sup>c)</sup>	-47
PCL	Caprolacton		50000	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	60	n.b. <sup>a)</sup>	-58 <sup>d)</sup>
PHB	3-Hydroxybuttersäure		54000	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	180	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> n.b.: nicht bestimmt

<sup>b)</sup> [MOCHIZUKI 1997]

<sup>c)</sup> kein Schmelzpeak im DSC beobachtet

<sup>d)</sup> [SERETOUDI et al. 2002]

Tabelle 4-4: GPC- und DSC-Messdaten der aromatischen Homopolyester

Polyester	Monomere		$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g mol <sup>-1</sup> ]	PD	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J g <sup>-1</sup> ]	$T_g$ [°C]
	Diol	Dicarbonsäure						
PET	1,2-Ethandiol	Terephthalsäure	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	260	44	75
PPT	1,3-Propandiol	Terephthalsäure	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	230	50	42
PBT	1,4-Butandiol	Terephthalsäure	45000	n.b. <sup>a)</sup>	n.b. <sup>a)</sup>	227	45	45
PPeT	1,5-Pentandiol	Terephthalsäure	22200	10800	2,0	130	40	10
PDT	Diethylenglykol	Terephthalsäure	25400	14500	1,8	72	28	18,5
PDI	Diethylenglykol	Isophthalsäure	27100	8600	3,1	-- <sup>b)</sup>	-- <sup>b)</sup>	10,5
PBI	1,4-Butandiol	Isophthalsäure	23500	13200	1,8	147	45	16,7

<sup>a)</sup> n.b.: nicht bestimmt

<sup>b)</sup> kein Schmelzpeak im DSC beobachtet

Tabelle 4-5: GPC- und DSC-Messdaten der aliphatischen Copolyester

Polyester	Monomere		$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g mol <sup>-1</sup> ]	PD	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J g <sup>-1</sup> ]	$T_g$ [°C]
	Diol	Dicarbonsäure <sup>a)</sup>						
BASu 10:90	1,4-Butandiol	Adipinsäure (10) Bernsteinsäure (90)	42800	8900	4,8	106	62	n.b. <sup>b)</sup>
BASu 30:70	1,4-Butandiol	Adipinsäure (30) Bernsteinsäure (70)	36400	19000	1,9	85	43	n.b. <sup>b)</sup>
BASu 50:50	1,4-Butandiol	Adipinsäure (50) Bernsteinsäure (50)	34600	19200	1,8	56	40	-51 <sup>c)</sup>
BASu 70:30	1,4-Butandiol	Adipinsäure (70) Bernsteinsäure (30)	53000	19000	2,8	42	55	n.b. <sup>b)</sup>
BASu 90:10	1,4-Butandiol	Adipinsäure (90) Bernsteinsäure (10)	45200	24100	1,9	55	60	n.b. <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> die Angaben in Klammern entsprechen den bei der Polykondensation eingesetzten mol% des entsprechenden Monomeren.

<sup>b)</sup> n.b.: nicht bestimmt

<sup>c)</sup> [NIKOLIC und DJONLAGIC 2001]

Tabelle 4-6: GPC- und DSC-Messdaten der aliphatisch-aromatischen Copolyester

Polyester	Monomere		$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g mol <sup>-1</sup> ]	PD	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J g <sup>-1</sup> ]	$T_g$ [°C]
	Diol	Dicarbonsäure <sup>a)</sup>						
BTA 40:60	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (40) Adipinsäure (60)	56700	30600	1,9	101	14	-39
BTK 40:60	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (40) Korksäure (60)	32000	17000	1,9	107	7	n.b. <sup>b)</sup>
BTSeb 40:60	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (40) Sebacinsäure (60)	27400	14400	1,9	98	21	n.b. <sup>b)</sup>
PTA 40:60	1,3-Propandiol	Terephthalsäure (40) Adipinsäure (60)	29200	15000	1,9	113	12	n.b. <sup>b)</sup>
PTSu 40:60	1,3-Propandiol	Terephthalsäure (40) Adipinsäure (60)	45200	22700	2,0	113	18	n.b. <sup>b)</sup>
NTA 70:30	Neopentylglykol	Terephthalsäure (70) Adipinsäure (30)	n.b. <sup>b)</sup>	n.b. <sup>b)</sup>		-- <sup>c)</sup>	-- <sup>c)</sup>	35

Fortsetzung von Tabelle 4-6:

Polyester	Monomere		$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$M_n$ [g mol <sup>-1</sup> ]	PD	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J g <sup>-1</sup> ]	$T_g$ [°C]
	Diol	Dicarbonsäure <sup>a)</sup>						
BTA 10:90	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (10) Adipinsäure (90)	36300	18200	2,0	57	39	-50
BTA 20:80	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (20) Adipinsäure (80)	36000	20000	1,8	52	31	-44
BTA 32:68	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (32) Adipinsäure (68)	44300	22200	2,0	79	12	-42
BTA 36:64	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (36) Adipinsäure (64)	44000	22000	2,0	93	11	n.b. <sup>b)</sup>
BTA 38:62	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (38) Adipinsäure (62)	50000	23800	2,1	100	10	n.b. <sup>b)</sup>
BTA 42:58	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (42) Adipinsäure (58)	47100	24800	1,9	115	11	n.b. <sup>b)</sup>
BTA 44:56	1,4-Butandiol	Terephthalsäure (44) Adipinsäure (56)	45000	21000	2,2	119	11	n.b. <sup>b)</sup>
DIA 20:80	Diethylenglykol	Isophthalsäure (20) Adipinsäure (80)	51300	8900	5,7	-- <sup>c)</sup>	-- <sup>c)</sup>	-38
DIA 40:60	Diethylenglykol	Isophthalsäure (40) Adipinsäure (60)	35500	6500	5,4	-- <sup>c)</sup>	-- <sup>c)</sup>	-30
DIA 60:40	Diethylenglykol	Isophthalsäure (60) Adipinsäure (40)	45100	9400	4,8	-- <sup>c)</sup>	-- <sup>c)</sup>	-16
DIA 80:20	Diethylenglykol	Isophthalsäure (80) Adipinsäure (20)	23000	6100	3,7	-- <sup>c)</sup>	-- <sup>c)</sup>	-6
BIA 20:80	1,4-Butandiol	Isophthalsäure (20) Adipinsäure (80)	54600	19400	2,6	38	42	-51
BIA 40:60	1,4-Butandiol	Isophthalsäure (40) Adipinsäure (60)	43300	20600	2,1	42	4	-38
BIA 60:40	1,4-Butandiol	Isophthalsäure (60) Adipinsäure (40)	80400	39100	2,0	77	12	-17
BIA 80:20	1,4-Butandiol	Isophthalsäure (80) Adipinsäure (20)	72600	33400	2,2	116	25	1

<sup>a)</sup> die Angaben in Klammern entsprechen den bei der Polykondensation eingesetzten mol% des entsprechenden Monomeren.

<sup>b)</sup> n.b.: nicht bestimmt

<sup>c)</sup> kein Schmelzpeak im DSC beobachtet



## 4.3 Charakterisierung der Polymere

### 4.3.1 Bestimmung der mittleren Molekulargewichte

Die Ermittlung der mittleren Molekulargewichte der Polyester erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie (GPC). Da es sich bei der GPC nicht um eine Absolutmethode handelt, muss vor der Messung eine Kalibrierung mit Polymeren (Polystyrol) enger Molekulargewichtsverteilung erfolgen. Die ermittelten Molekulargewichte repräsentieren somit solche von Polystyrol mit dem gleichen Eluationsverhalten.

Probenkonzentration:	aliphatische Homopolyester: 5 mg ml <sup>-1</sup> aromatenhaltige Substanzen: 1 mg ml <sup>-1</sup>
Probenvolumen:	100 µl
Temperatur:	20°C-25°C (Raumtemperatur)
Mobile Phase:	Chloroform (HPLC grade, entgast)
Flussrate:	1 ml min <sup>-1</sup>
Vorsäule:	Phenogel 5 guard, 50 x 7,8 mm, LATEK Eppelheim
Trennsäule:	Phenogel-Säulen, 300 x 7,8 mm, LATEK Eppelheim Ausschlußgrenzen: 5·10 <sup>3</sup> Å oder 5·10 <sup>4</sup> Å
Detektor:	RI-Detektor: SDK Shodex RI SE-51 UV-Detektor: Gynkotec SP-6V
Pumpe:	Gynkotec 300 C, Gynkotec, Deutschland

### 4.3.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die Schmelzpunkte der Polymermaterialien, d.h. die Maxima der Kristallitschmelzpunkte, wurden mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) (Mettler DSC 12E mit Mettler Software TA 89 E, Mettler Toledo, Schweiz) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine thermische Analysemethode, bei der physikalische und chemische Eigenschaften einer Substanz, eines Substanzgemisches und/oder von Reaktionsgemischen als Funktion der Temperatur oder der Zeit gemessen werden, wobei die Probe einem kontrollierten Temperaturprogramm unterworfen ist [Benzler 1982]. So können Übergangstemperaturen mit den dazugehörigen Wärmekapazitäten bei Glasübergängen bzw. Enthalpien bei Schmelz- und Kristallisationsvorgängen gemessen werden. Eine Beispielkurve ist in Abb. 4-3 dargestellt.

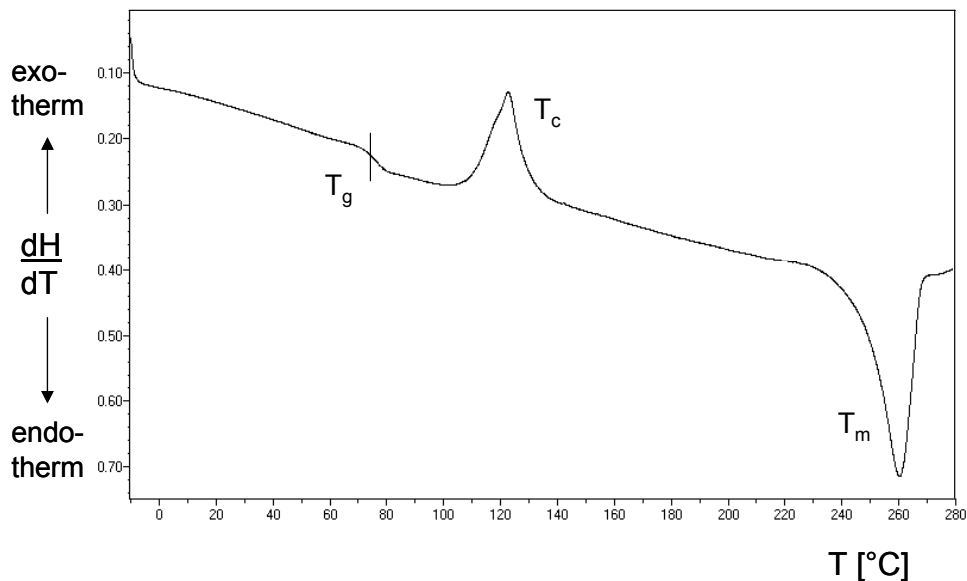


Abb. 4-3: DSC-Diagramm von Polyethylenterephthalat ( $T_g$ =Glastemperatur,  $T_c$ =Rekristallisation,  $T_m$ = Schmelztemperatur) Aufheizrate:  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Beim Aufwärmen von Polymeren treten drei charakteristische Umwandlungstemperaturen auf:

- 1) die Glastemperatur (Übergang Glaszustand→Gummizustand): Bei Überschreiten der Glastemperatur erweichen die glasförmig erstarrten, amorphen Polymerketten und gehen in einen Zustand erhöhter Flexibilität über. Es handelt sich thermodynamisch um einen Phasenübergang 2. Ordnung. Phasenübergänge 1. Ordnung, wie z.B. dem Schmelzen, verlaufen unter Änderung von Enthalpie und Volumen. Bei einem Phasenübergang 2. Ordnung ändern sich die 1. Ableitungen dieser Eigenschaften, wie z.B. die Wärmekapazität als 1. Ableitung der Enthalpie (H) nach der Temperatur (T).
- 2) die Kristallisationstemperatur (Übergang Gummizustand→kristalline Phase): Da die Glastemperatur unterhalb der Schmelztemperatur liegt kann es zu einer Rekristallisation der erweichten amorphen Polymerketten kommen.
- 3) die Schmelztemperatur (Übergang kristalline Phase→Schmelze): Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Kristalle innerhalb eines Polymeren existiert kein scharfer Schmelzpunkt, sondern eine Schmelzbereich. Die Fläche unterhalb dieses Schmelzbereiches/Schmelzpeakes ist der Schmelzenthalpie  $\Delta H_m$  proportional.

## **4.4 Herstellung der Polyesterfilme**

### **4.4.1 Filme teilkristalliner Polyester**

Um genau definierte Oberflächen zu erhalten, wurden Polyesterfilme durch ein Schmelzpress-Verfahren hergestellt. Als Presswerkzeug diente eine Hydraulikpresse (Ident.-Nr. 062566, Perkin Elmer, Überlingen) mit zwei thermostatisierbaren Metallplatten (PIN 15515, Specac, England), sowie verschiedenen Distanzringen, die die Filmdicke festlegen. Das Polymermaterial wurde auf die mit Silikonpapier bedeckten Heizplatten, in den Distanzring gewünschter Dicke gegeben und in der Presse bei einem Druck von 2 Tonnen zwei Minuten gepresst. Die Presstemperatur wurde dabei jeweils ca. 5°C unterhalb des Schmelzpunktes des zu pressenden Polymeren gewählt. Mit Hilfe eines Stanzeisens wurden dann Filme mit definierten Durchmessern von 0,9 cm ausgestanzt.

Filme, die in Abbauprobversuchen bei einer Messtemperatur oberhalb der Schmelztemperatur des Polyesters eingesetzt wurden, wurden in Filterpapier (Schwarzbandfilter, Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) eingepresst.

### **4.4.2 Filme amorpher Polyester**

Zur Herstellung amorpher Polyesterfilme, z.B. PDA, für den enzymatischen Abbauprobtest, wurde 1 g PDA in 5 ml Aceton gelöst und jeweils 1 ml dieser Lösung direkt in ein 10 ml-Schnappdeckelgefäß für den enzymatischen Abbauprobtest gegeben. Nachdem das Aceton vollständig abgedampft war (1 Tag bei Raumtemperatur) wurde das Schnappdeckelglas im Enzymtest eingesetzt. Um zu verhindern, dass der Magnetrührer auf dem amorphen Polymerfilm kleben bleibt, wurde der Kern in einer Aufhängung befestigt, so dass er ca. 3 mm oberhalb des Filmes rührte.

## 4.5 Herstellung der Polyesterkugeln

Zur Herstellung von Polyesterkugeln mit definierten Durchmessern wurden 2 g Polymer in 50 ml eines wasserlöslichen Lösungsmittels gelöst (s. Tabelle 4-7) und dann mit einer 20 ml Spritze in ein 2000 ml Becherglas, das mit bidestilliertem Wasser gefüllt war, eingetropf. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften nimmt das Polymer im Wasser Kugelform an. Die Kugeln wurden über ein Analysensieb (Analysensieb mit 50 µm Maschenweite, Firma Retsch, Haan, Deutschland) abgefiltert und 48 Stunden im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Kugeln über Analysensiebe mit unterschiedlichen Maschenweiten, auf einem Schüttler (Firma Retsch, Haan, Deutschland), in Fraktionen nach ihren Durchmessern getrennt. Die Fraktionen lagen in einem Bereich von 50-1000 µm.

## 4.6 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

### 4.6.1 Herstellung der Nanopartikel

Zur Herstellung der Nanopartikel wurden 100 mg des Polyesters in 10 ml eines wasserlöslichen Lösungsmittels gelöst (Abweichungen von dieser Konzentration z.B. für eine Variation der Partikelgröße sind in Tabelle 4-8 dargestellt). Es ist darauf zu achten, dass das verwendete Lösungsmittel einen Siedepunkt unterhalb dem des Wassers besitzt, da es nach der Fällung aus dem Gemisch wieder entfernt werden muss (Angaben über die verwendeten Lösungsmittel s. Tabelle 4-7).

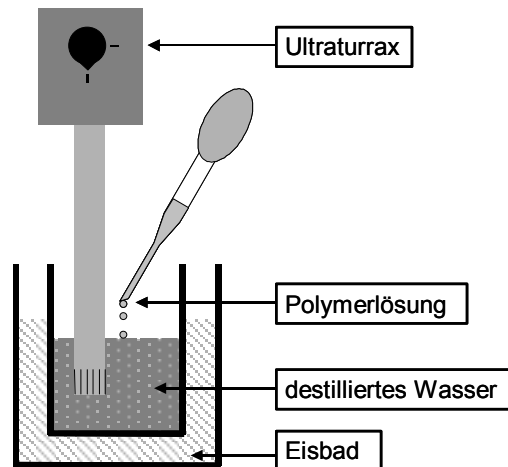
Tabelle 4-7: Verwendete Lösungsmittel zur Herstellung der Nanopartikel

Lösungsmittel	Polymer
Aceton	aliphatische Homopolyester mit kurzkettigen Dicarbonsäuren (z.B. SP 4/6)
Tetrahydrofuran	aliphatische Homopolyester mit langkettigen Dicarbonsäuren (z.B. SP 4/12), PHB, aliphatische Copolyester, aliphatisch-aromatische Copolyester, PDI, PDT
Trifluorethanol	PPeT, PBI
Hexafluoroisopropanol	PET, PPT, PBT

Unter starkem Rühren mittels eines Ultraturraxes (TP 25, Jahnke & Kunkel KG, IKA-Werk, Staufen i. Breisgau) bei  $8000 \text{ U min}^{-1}$ , wurden 10 ml der Polymerlösung langsam in 100 ml bidestilliertes Wasser getropft (s Abb. 4-4).

Abb. 4-4:

Herstellung der Nanopartikel durch Eintropfen einer Polymerlösung in destilliertes Wasser unter Rühren mittels Ultraturraxes (8000 U min<sup>-1</sup>).



Eventuell ausgefallenes Polymer wurde abgefiltert und anschließend das organische Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers aus dem Gemisch entfernt. Zur Bestimmung der Polymerkonzentration wurden zweimal je 1 ml und zweimal je 5 ml der Suspension bei 40°C für 24 Stunden eingetrocknet und anschließend die Polymertrockenmasse bestimmt.

Es ist möglich, Partikel mit einem Durchmesser von 50 bis 250 nm reproduzierbar herzustellen. Die Partikelgröße kann durch die Wahl einer bestimmten Konzentration der Polymerlösung gezielt eingestellt werden, je konzentrierter die Ausgangslösung ist, desto größer sind die erhaltenen Partikel. Partikel mit Durchmessern größer als 250 nm konnten nicht hergestellt werden, da diese Partikel bereits bei der Herstellung aufgrund der relativ hohen Ausgangskonzentration agglomerierten. Angaben zu den verwendeten Polymerkonzentrationen und den resultierenden Partikelgrößen sind in Tabelle 4-8 exemplarisch anhand einiger Polyester zusammengefasst.

Die resultierende Feststoffkonzentration der Suspension beträgt durchschnittlich nur 6 mg ml<sup>-1</sup> und weist damit eine relativ geringe Partikeldichte auf. Da bei der Herstellung der Partikel bewusst auf oberflächenstabilisierende Hilfsmittel verzichtet wurde, konnte eine höhere Partikelkonzentration nicht erreicht werden. Bei Konzentrationen oberhalb von 6 mg ml<sup>-1</sup> traten Ausflockungen bzw. Filmbildung in den Suspensionen auf.

Die oberflächenstabilisierenden Hilfsmittel beeinflussen sowohl die Aktivität der Enzyme [HELISTÖ und KORPOLA 1998, WALTER et al. 1995] als auch die freie Oberfläche, die dem Enzym zur Verfügung steht, da sie schon durch die oberflächenstabilisierenden Hilfsmittel blockiert werden könnte. Sowohl die Enzymaktivität als auch die freie Oberfläche sind wichtige Faktoren, die die Abbaugeschwindigkeit eines Polymeren beeinflussen.

Die Suspensionen sind auch ohne Stabilisatoren bei einer Lagerung bei Raumtemperatur über mehrere Wochen, teilweise sogar über Monate stabil.

### 4.6.2 Bestimmung der Partikelgröße der Nanopartikel

Ein Standardverfahren zur Bestimmung der Partikelgröße kleinster Partikel ist die Methode der dynamischen Lichtstreuung. Im Gegensatz zur statischen Lichtstreuung, bei der mittlere Streulichtintensitäten bestimmt werden, werden bei der dynamischen Lichtstreuung (Photonenkorrelationsspektroskopie = PCS) die Schwankungen der Streulichtintensität, die durch die Bewegung von Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung verursacht werden, gemessen.

Die statische Lichtstreuung geht von der Existenz eines thermodynamischen Gleichgewichtes der Systeme aus. Die Registrierzeit für das gebeugte Licht ist sehr lang im Vergleich zu den Bewegungen der Partikel. Es werden folglich nur Mittelwerte über alle möglichen Konformationen erfasst, nicht aber die aktuelle Situation während des Lichtstreuvorganges selbst. Im Gegensatz dazu liegen bei der dynamischen Lichtstreuung sehr geringe Registrierzeiten ( $10^{-6}$  s) vor, was dazu führt, dass eine starke Intensitätsfluktuation gemessen wird. Ursache dieser Fluktuationserscheinungen ist die Brownsche Bewegung mehrerer Partikel, die zusammentreffen und das eingestrahlte Licht streuen.

Da die Brownsche Molekularbewegung statistischer Natur ist, kommt es zu einer teilchengrößenabhängigen Frequenzverbreiterung des eingestrahlten Lichtes bzw. des Streulichtes (s. Abb. 4-5). Grundlage dieser Frequenzverbreiterung ist das Doppler-Prinzip.

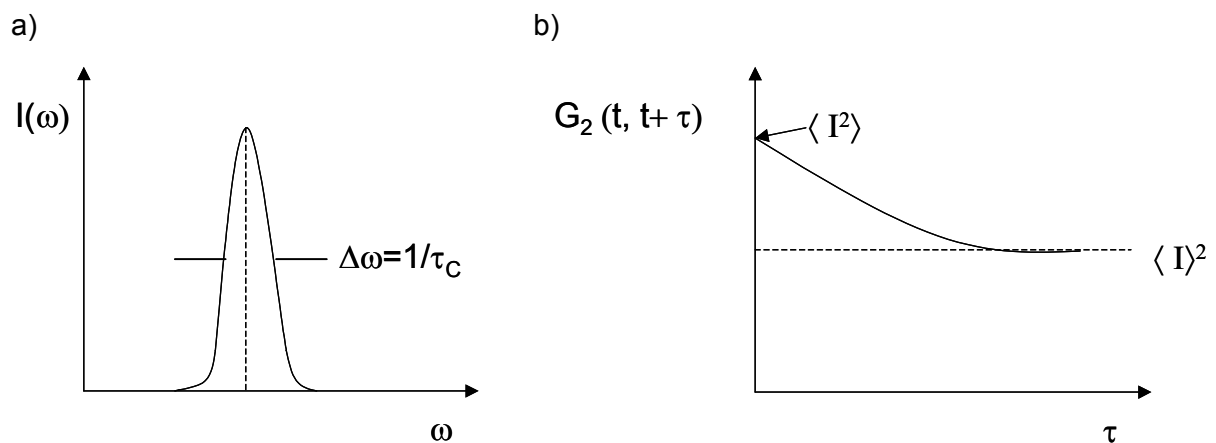


Abb. 4-5: a) Frequenzspektrum durch statistische Fluktuation ( $\omega$ : Frequenz,  $\Delta\omega$ : Halbwertsbreite,  $\tau_C$ : Fluktuationszeit) b) Autokorrelationsfunktion

Bei der PCS wird, um eine hohe Auflösung der Halbwertsbreite zu erreichen, anstelle des Frequenzspektrums der Streuintensität die fourier-transformierte Form des Frequenzspektrums, die sogenannte Autokorrelationsfunktion gemessen. Hierzu wird die

Streulichtintensität mittels eines Photomultipliers erfasst und an einen Korrelator weitergeleitet. Dort werden die Messdaten zeitgerastert nach Messkanälen geordnet abgespeichert und die Autokorrelationsfunktion aufgebaut. Diese Autokorrelationsfunktion der Intensität der Streustrahlung wird mathematisch folgendermaßen definiert:

$$G_2(t, t + \tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle$$

Gleichung 4-1

Die Autokorrelationsfunktion 2. Ordnung ( $G_2$ ) liefert eine Aussage über die Korrelation eines Intensitätszustandes  $I$  zum Zeitpunkt  $(t + \tau)$  mit dem Zustand zum Zeitpunkt  $t$ .

Zur Auswertung wird die Autokorrelationsfunktion zunächst normiert (s. Gleichung 4-2)

$$g_2(t, t + \tau) = \frac{G_2(t, t + \tau)}{\langle I^2 \rangle}$$

Gleichung 4-2

und in die normierte Autokorrelationsfunktion 1. Ordnung (Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes) umgerechnet (s. Gleichung 4-3).

$$g_1(t, t + \tau) = \exp\left(-\frac{\tau}{t_c}\right)$$

Gleichung 4-3

Es handelt sich um eine exponentiell abklingende Funktion, aus deren Steigung bei einer logarithmischen Auftragung die Zeit  $t_c$  der Fluktuation folgt. Aus  $t_c$  lässt sich nach Gleichung 4-4 der Diffusionskoeffizient berechnen.

$$D = \frac{1}{K^2 t_c}$$

Gleichung 4-4

$D$  = Diffusionskoeffizient [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]

$K$  = Streuvektor [ $\text{cm}^{-1}$ ]

Der Streulichtvektor  $K$  ist für ein gegebenes System (Streuwinkel  $\theta$ , Laserwellenlänge  $\lambda_0$ , Brechungsindex des Dispersionsmediums  $n_b$ ) konstant (s. Gleichung 4-5).

$$K = \frac{4\pi n_b}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$$

Gleichung 4-5

Der hydrodynamische, kugeläquivalente Partikeldurchmesser kann dann aus dem Diffusionskoeffizienten  $D$  mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 4-6) berechnet werden.

$$d = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

Gleichung 4-6

$D$ = Diffusionskoeffizient [ $10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ]

$k$ = Boltzmann-Konstante [ $\text{kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ]

$T$ = Temperatur [K]

$\eta$ = Viskosität des Dispersionsmediums [ $\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]

$d$ = Teilchendurchmesser [m]

Im Gegensatz zu monodispersen Proben besitzt bei polydispersen Systemen jede Partikelgröße eine eigene Abklingkonstante. Daher ist die erhaltene Autokorrelationsfunktion ein Produkt mehrerer Einzelfunktionen von verschiedenen großen Partikeln. Zur Berechnung der tatsächlichen Partikelgrößenverteilung wurden verschiedene mathematische Näherungen entwickelt, wie z.B. die Kumulantenmethode. Hierbei wird die Autokorrelationsfunktion logarithmiert, so dass sich für den Idealfall (monodisperses System) eine Gerade ergeben sollte. An diese logarithmierte Autokorrelationsfunktion wird nach der Methode der kleinsten Quadrate ein Polynom angepasst, dessen Anfangssteigung den sogenannten intensitätsgemittelten Durchmesser (z-average) darstellt. Aus der Krümmung des Polynoms ergibt sich die Polydispersität der Verteilung. Bei dieser Auswertung wird eine Gauß-Verteilung der Durchmesser angenommen.

Üblicherweise werden für die Bestimmung der Partikelgrößen Geräte mit Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 633 nm) und einem Streuwinkel von  $90^\circ$  benutzt. Zur Bestimmung der Partikelgrößen wurde ein Zetaziser 3 der Firma Malvern (England) verwendet. Das Verfahren erlaubt die Teilchengrößenbestimmung im Bereich zwischen 5 nm und 5  $\mu\text{m}$ .

### Polydispersität der Nanopartikel

In der Praxis treten streng monodisperse Partikelsysteme selten auf. Es handelt sich meist vielmehr um polydisperse Proben. Um eine Aussage über die Partikelgrößenverteilung zu



erhalten, wurden die Polydispersitäten der Nanopartikelsuspensionen bestimmt, die dem Variationskoeffizienten, der sich nach Gleichung 4-7 berechnet, entspricht:

$$PD = \frac{s}{r}$$

Gleichung 4-7

PD= Polydispersität

s= Standardabweichung [nm]

r= Mittlerer Radius der Partikel [nm]

Der Variationskoeffizient ist eine dimensionslose Zahl, die einen direkten Vergleich der Streuung und damit der Verteilungsdichte der Messwerte erlaubt. Durch Integration der Gaußschen Normalverteilung ergibt sich, dass 68,3% aller Werte einer Idealverteilung um 1 s um den Mittelwert streuen, 95,4% um 2 s und 99,7% um 3 s.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikelsuspensionen ergaben sich Werte für die Polydispersität von  $PD \approx 0,1$ . Dieser Wert deutet auf eine geringe Verteilung der Partikelgröße hin.

Für SP 4/6-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 200 nm und einer Polydispersität von 0,029 ergibt sich eine Standardabweichung  $s=2,9$  nm, was bedeutet, dass 68,3% aller Partikel um 2,9 nm um den Radius von 100 nm streuen. Der Radius von 68,3% der Partikel beträgt demnach  $100 \pm 2,9$  nm.

Eine breitere Verteilungsdichte wiesen hingegen SP 4/8-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 197 nm und einer Polydispersität von 0,108 auf. Aus diesen Werten ergibt sich eine Standardabweichung von  $s=10,6$  nm, was bedeutet, dass 68,3% aller Teilchen einen Partikelradius von  $98,5 \pm 10,6$  nm aufweisen, bzw. einen Durchmesser von  $197 \pm 21,2$  nm.

Die PPeT-Nanopartikel ergaben einen Durchmesser von 50 nm und eine Polydispersität von 0,1. Hieraus ergibt sich ein Wert für die Standardabweichung von  $s=2,5$ . In diesem Fall streuen die Radien von 68,3% aller Teilchen um 2,5 nm um den mittleren Radius von 25 nm.

Zur Berechnung der Oberflächen der Nanopartikel, die in den enzymatischen Abbautests eingesetzt wurden, wurden die mittels Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmten Mittelwerte der Durchmesser der Nanopartikel unabhängig von deren Größenverteilung eingesetzt. Als Dichte wurde für alle Polyester, unabhängig von der Kristallinität, ein Wert von  $1,3 \text{ g cm}^{-3}$  angenommen. Dieser Wert entspricht der Dichte von PET ( $\rho=1,3 \text{ g cm}^{-3}$ ) [BRANDRUP und IMMERGUT 1975].

Die Oberfläche eines Nanopartikels errechnet sich unter der Annahme einer monodispersen Partikelgrößenverteilung nach Gleichung 4-8 (s. Anhang Gleichung 8-1 bis Gleichung 8-4).

$$A = \frac{m_t}{\rho_p} \cdot \frac{6}{d_p}$$

Gleichung 4-8

$m_t$ = Gesamtmasse der Nanopartikel [g]

$\rho_p$ = Dichte des Polyesters [g cm<sup>-3</sup>]

$d_p$ = Durchmesser eines Nanopartikels [cm]

Tabelle 4-8: Charakteristiken einiger Nanopartikelsuspensionen

Polyester	Konzentration der Polymerlösung bei der Herstellung [mg ml <sup>-1</sup> ]	Partikelgröße [nm]	Polydispersität	Oberfläche [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]
SP 4/6	2	100	0,105	46,15
SP 4/6	2	110	0,146	41,96
SP 4/6	10	190	0,080	24,29
SP 4/6	10	200	0,029	23,08
SP 4/6	10	200	0,117	23,08
SP 4/6	15	220	0,067	20,98
SP 4/6	20	260	0,138	17,75
SP 4/8	10	229	0,087	20,15
SP 4/10	10	160	0,144	28,85
SP 4/12	10	316	0,120	14,61
BTA 40:60	2	121	0,119	38,14
BTA 40:60	6	171	0,098	26,99
BTA 40:60	10	202	0,116	22,85
BTA 40:60	20	225	0,148	20,51
PBI	10	53	0,152	87,08
PDI	10	202	0,115	22,85
PBT	10	73	0,133	63,22
PPeT	10	52	0,116	88,76
PET	10	95	0,113	48,58

## 4.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Feststoffpulver der Enzyme wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Der Methode liegt die Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes in alkalischer Lösung zugrunde. Dieser Komplex reagiert mit einer Folin-Ciocalteau-Reagenz unter Bildung von Farbkomplexen, deren Intensität direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Die jeweiligen Konzentrationen können photometrisch bei 750 nm bestimmt werden.

## 4.8 Enzymatischer Abbautest

Das in dieser Arbeit verwendete Messprinzip für den enzymatischen Abbau der Polyester basiert auf einer kontinuierlichen Bestimmung freigesetzter Säuren in einem automatisierten pH-Stat Versuch.

Die verwendeten Lipasen sind eine Untergruppe der Esterasen, die die hydrolytische Spaltung von Esterbindungen katalysieren. Sie spalten unter Einbau von Wasser Esterbindungen zu Säure und Alkohol. Durch kontinuierliche Neutralisation der gebildeten Säure bei pH 7.0, können Rückschlüsse auf die Anzahl der gespaltenen Esterbindungen ( $n_{\text{exp}}$ ) gezogen werden (Gleichung 4-9).

$$n_{\text{exp}} = V_{\text{Lauge}} \cdot c_{\text{Lauge}}$$

Gleichung 4-9

$n_{\text{exp}}$ = gesplattene Esterbindungen [ $\mu\text{mol}$ ]  
 $V_{\text{Lauge}}$ = zudosiertes Laugenvolumen [ $\mu\text{l}$ ]  
 $c_{\text{Lauge}}$ = Konzentration der Lauge [ $\mu\text{mol } \mu\text{l}^{-1}$ ]

Die theoretisch möglichen Esterspaltungen berechnen sich z.B. für den aliphatischen Homopolyester SP 4/6 mit einer Molmasse der Repetiereinheit ( $M_{\text{Rep}}$ ) von  $200,26 \text{ g mol}^{-1}$  und zwei Esterbindungen pro Repetiereinheit ( $n_{\text{EB}/\text{Mrep}}$ ) nach Gleichung 4-10.

$$n_{\text{EB}} = \frac{m_v}{M_{\text{Rep}}} \cdot n_{\text{EB}/\text{Mrep}}$$

Gleichung 4-10

$n_{\text{EB}}$ = theoretisch vorhandene Estergruppen [ $\mu\text{mol}$ ]  
 $m_v$ = Substratmasse vor dem Abbau [ $\mu\text{g}$ ]  
 $M_{\text{Rep}}$ = Molmasse einer Repetiereinheit [ $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$ ]  
 $n_{\text{EB}/\text{Mrep}}$ = Anzahl von Esterbindungen in einer Repetiereinheit

Die Betrachtung der eingetretenen Esterspaltungen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes führt zu einer Abbaurrate der Esterbindungen ( $AR_{enz}$ ) (Gleichung 4-11)

$$AR_{enz} = \frac{dn_{exp}}{dt}$$

Gleichung 4-11

$AR_{enz}$  = Spaltungsrate [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]

$\Delta n_{exp}$  = gespaltene Estergruppen im Zeitraum  $\Delta t$  [ $\mu\text{mol}$ ]

$\Delta t$  = betrachteter Zeitraum [min]

#### 4.8.1 Messanordnung für die enzymatischen Abbautests

Die Titration erfolgte mittels eines Autotitrationssystems (s. Abb. 4-6) (pH-Stat-Titrationssystem bestehend aus einer Autobürette (ABU 901; 2 ml-Bürette der Firma Radiometer, Kopenhagen) und einer Kontrolleinheit (PHM 290 der Firma Radiometer, Kopenhagen).

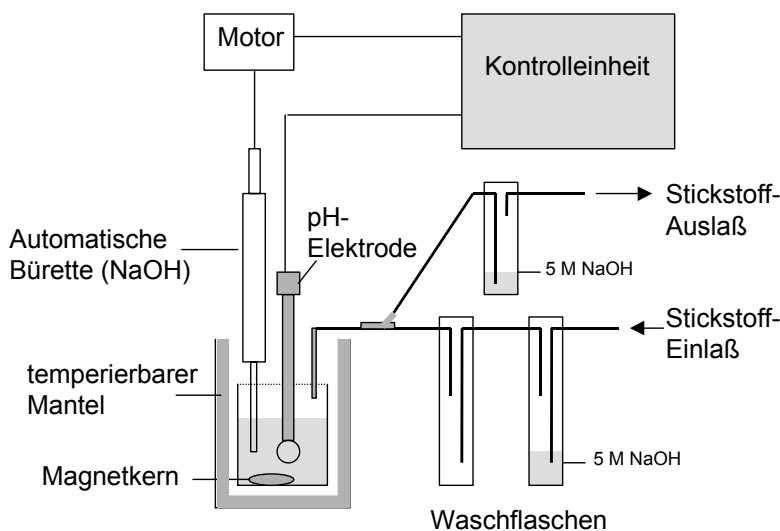


Abb. 4-6: Versuchsaufbau zum enzymatischen Abbautest mittels pH-Stat-Titration.

Als Reaktionsgefäß dient ein 10 ml-Schnappdeckelgefäß, durch dessen Gummideckel neben der Kanüle für die Zugabe von Natronlauge (0.01 M) auch eine pH-Elektrode (Vielzweck kombinierte pH-Elektrode mit KCl-Ionenbrücke, Radiometer Kopenhagen) direkt in die Reaktionslösung geführt wurde. Durch eine weitere Kanüle, dessen Spitze oberhalb der Reaktionslösung fixiert war, wurde kontinuierlich Stickstoff über die Reaktionslösung geleitet, um das Eindringen von sauer reagierendem Kohlendioxid zu verhindern. Das Durchmischen der Reaktionslösung erfolgte mit Hilfe eines kleinen Magnetkerns (Länge 0,9 cm,  $\varnothing=0,2$  cm)

bei einer Rührgeschwindigkeit von  $700 \text{ U min}^{-1}$ . Ein doppelwandiger offener Glasreaktor mit angeschlossenem Thermostatbad (Thermostat M3, mgw Lauda, Lauda-Königshofen) diente als Temperiermantel, um eine konstante Messtemperatur zu gewährleisten.

Die Elektrode wurde alle 24 h neu kalibriert und die Bürette vor jeder neuen Messung gespült.

#### 4.8.2 Herstellung der Enzymlösungen

Für die enzymatischen Abbaustests wurden von den Feststoffpulvern der Enzyme Lösungen in 0.9%iger Natriumchloridlösung (autoklaviert) mit unterschiedlichen Feststoffgehalten hergestellt (s. Tabelle 4-9), und diese dann in Aliquote der entsprechenden Volumina (500  $\mu\text{l}$ , bzw. 256  $\mu\text{l}$ ) abgefüllt und eingefroren. Diese Lösungen sind bei  $-20^\circ\text{C}$  maximal 2 Monate stabil. Aus den Stammlösungen wurden dann unmittelbar vor den enzymatischen Abbauntersuchungen eventuelle Verdünnungen hergestellt, die, zur Vermeidung einer möglichen Aktivitätsabnahme, nicht wieder eingefroren wurden.

Tabelle 4-9: Feststoffgehalt der verwendeten Enzymlösungen

Enzym	Protein- gehalt [%]	Einwaage <sup>a)</sup> [mg <sub>Feststoff</sub> ml <sup>-1</sup> ]
Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i> (AoL)	60	16,67
Lipase aus <i>Candida antarctica</i> (CaL)	40	5
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i> (CcL)	40	5
Lipase aus <i>Mucor miehei</i> (MmL)	90	2,22
Lipase aus <i>Porcine pancreas</i> (PpL)	25	8
Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i> (PcL)	10	20
Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PfL)	100	2
Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> (PsL)	50	4
Hydrolase aus <i>Thermomonospora Fusca</i> (TfH)	5	40
Proteinase K	100	2

<sup>a)</sup> Einwaage an Feststoff zur Erzielung einer Proteinkonzentration von  $2 \text{ mg ml}^{-1}$

#### 4.8.3 Enzymatischer Abbau von Polymerfilmen

Ein zuvor gewogener Polymerfilm ( $\varnothing=0,9 \text{ cm}$ ) wurde in dem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit einer Menge an 0.9%iger Natriumchloridlösung versetzt, so dass das Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß nach dem Zusatz der Enzymlösung 6 ml betrug. Die Lösung wurde

temperiert und der pH-Wert mit 0,01 M Natronlauge auf pH 7,0 (+0,1) eingestellt. Anschließend wurde die Autotitration gestartet. Nachdem die Kontrolleinheit nach 2 Minuten den ersten Messwert aufgezeichnet hatte, wurde mittels einer Spritze die Enzymlösung (2  $\text{mg}_{\text{Protein}} \text{ml}^{-1}$ , 256  $\mu\text{l}$ ) zudosiert.

#### 4.8.4 Enzymatischer Abbau von Polyesterkugeln

500 mg der Polyesterkugeln mit einem Durchmesser von 100-150  $\mu\text{m}$  wurden in dem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 5,5 ml 0.9%iger Natriumchloridlösung versetzt. Der Magnetkern wurde mit Hilfe einer Halterung so in dem Reaktionsgefäß fixiert, dass er ca. 3 mm über dem Glasboden hing. Mit dieser Konstruktion sollte ein Zermahlen der Kugeln durch den Magnetkern verhindert werden. Die Lösung wurde temperiert und der pH-Wert mit 0,01 M Natronlauge auf pH 7.0 (+0.1) eingestellt und anschließend die Autotitration gestartet. Nachdem die Kontrolleinheit nach 2 Minuten den ersten Messwert aufgezeichnet hatte, wurde mittels einer Spritze die Enzymlösung (Lipase aus *Candida cylindracea*, 2  $\text{mg}_{\text{Protein}} \text{ml}^{-1}$ , 500  $\mu\text{l}$ ) zudosiert.

#### 4.8.5 Enzymatischer Abbau der Polyester-Nanopartikeln

Das berechnete Volumen der Nanopartikel-Suspension, welches einem Polymergehalt von 0,7 mg entsprach, wurde mit bidestilliertem Wasser so weit aufgefüllt, so dass das Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß nach Enzymzugabe ebenfalls 6 ml betrug. Hier durfte keine 0.9%ige Natriumchloridlösung verwendet werden, da die Suspension sonst ausflockte. Die Lösung wurde temperiert und der pH-Wert mit 0,01 M Natronlauge auf pH 7.0 (+0.1) eingestellt und anschließend die Autotitration gestartet. Nachdem die Kontrolleinheit nach 0,5 Minuten den ersten Messwert aufgezeichnet hatte, wurde mittels einer Spritze die Enzymlösung (2  $\text{mg}_{\text{Protein}} \text{ml}^{-1}$ , 500  $\mu\text{l}$ , Ausnahme: Lipase aus *Pseudomonas species*: 256  $\mu\text{l}$ ) zudosiert.

Bei den Abbauversuchen mit unterschiedlichen Proteinmengen (s. Kapitel 5.3) wurde neben der Konzentration der Enzymlösung (0,2  $\text{mg}_{\text{Protein}} \text{ml}^{-1}$  und 2  $\text{mg}_{\text{Protein}} \text{ml}^{-1}$ ) auch das zudosierte Volumen der Enzymlösung (50  $\mu\text{l}$ -500  $\mu\text{l}$ ) variiert.

Zur Bestimmung der rein chemischen Hydrolyse der Polyester wurden die Tests analog den vorstehenden Beschreibungen aber ohne Enzymzugabe durchgeführt.

#### 4.8.6 Enzymatischer Abbau von gelösten Polymeren

Um den enzymatischen Abbau von Polyestern unabhängig von polymerspezifischen Faktoren wie z.B. der Kristallinität untersuchen zu können, wurden die Abbauraten der Polymere in Lösung untersucht. Dazu wurden Polyesterlösungen in einem organischen, nicht wassermischbaren Lösungsmittel emulgiert.

Emulsionslösung: 4,475 g NaCl, 0,103 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 190 g Glycerin (87 %) wurden in einem 250 ml Messkolben unter Rühren gelöst und anschließend wurde langsam 1,5 g Gummi Arabicum als Emulgator hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde auf 250 ml aufgefüllt und die Lösung für 2 h gerührt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur einen Monat haltbar.

Polymerlösung: 10 mg Polymer wurde in 1 ml destilliertem Toluol gelöst.

1 ml der Polymerlösung wurde mit 4 ml der Emulsionslösung und 3,6 ml destilliertem Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde direkt vor seinem Einsatz im Enzymtest angesetzt und mittels eines Ultraturraxes (TP 25, Jahnke & Kunkel KG, IKA-Werk, Staufen i. Breisgau) 1 min bei  $13500 \text{ U min}^{-1}$  homogenisiert. Anschließend wurden 5,5 ml von dieser Emulsion abgenommen und in dem Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Emulsion wurde temperiert und der pH-Wert 0,01 M Natronlauge auf pH 7.0 (+0.1) eingestellt und anschließend die Autotitration gestartet. Nachdem die Kontrolleinheit nach 0,5 Minuten den ersten Messwert aufgezeichnet hatte, wurde mittels einer Spritze die Enzymlösung ( $2 \text{ mg}_{\text{Protein}} \text{ ml}^{-1}$ , 500  $\mu\text{l}$ ) zudosiert.

#### 4.8.7 Enzymatischer Abbau von Ölen

Die zur Aktivitätsbestimmung verwendeten Triglyceride, Triolein und Triacetin, lagen bei den Versuchstemperaturen als Öle vor. Da die Lipaseaktivität stark von der Oberfläche des angebotenen Substrates abhängig ist, wurden die Triglyceride zur Aktivitätsbestimmung in wässrigem Milieu emulgiert.

Emulsionslösung: 4,475 g NaCl, 0,103 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 190 g Glycerin (87 %) wurden in einem 250 ml Messkolben unter Rühren gelöst und anschließend wurde langsam 1,5 g Gummi Arabicum als Emulgator hinzugefügt. Mit destilliertem Wasser wurde auf 250 ml aufgefüllt und die Lösung für 2 h gerührt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur einen Monat haltbar.

Substratlösung: 0,5 ml Triolein und 0,5 ml Triacetin wurden mit 4 ml der Emulsionslösung und 3,6 ml destilliertem Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde direkt vor seinem Einsatz im Enzymtest angesetzt und mittels Ultra-Turrax (TP 25, Jahnke & Kunkel KG, IKA-Werk, Staufen i. Breisgau) 1 min bei 13500 U min<sup>-1</sup> homogenisiert.

5,5 ml der Substratlösung wurden in dem Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Lösung wurde temperiert und der pH-Wert 0,01 M Natronlauge auf pH 7.0 (+0.1) eingestellt und anschließend die Autotitration gestartet. Nachdem die Kontrolleinheit nach 0,5 Minuten den ersten Messwert aufgezeichnet hatte, wurde mittels einer Spritze die Enzymlösung zudosiert.

#### Temperaturstabilität der Lipasen

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der Lipasen wurden jeweils 500 µl der Lipaselösung der in Tabelle 4-9 angegebenen Konzentrationen bei unterschiedlichen Lagertemperaturen in einem Thermomixer (5436, Eppendorf, Hamburg, 900 U min<sup>-1</sup>) geschüttelt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Cups entnommen und bei -20°C bis zur Bestimmung der Aktivität eingefroren. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach der Vorschrift des enzymatischen Abbaus von Ölen.

#### Temperaturoptimum der Lipasen

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums der Lipasen wurde von jeweils 500 µl der Lipaselösung der in Tabelle 4-9 angegebenen Konzentrationen, die Aktivität bei unterschiedlichen Messtemperaturen nach der obigen Vorschrift zum enzymatischen Abbau von Ölen bestimmt.

#### pH-Optimum der Lipasen

Zur Ermittlung des pH-Optimums der Lipasen wurde die Aktivität der jeweiligen Lipase (Konzentrationen s. Tabelle 4-9) bei unterschiedlichen pH-Werten nach der obigen Vorschrift zum enzymatischen Abbau von Ölen bestimmt.



## 4.9 Berechnung der korrigierten Abbauraten

Um den Einfluss der Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Katalyse auf die Temperaturabhängigkeit der Abbauraten der Polyester zu berücksichtigen, wurde eine Korrektur der Polyester-Abbauraten nach Gleichung 4-12 durchgeführt.

$$P_{\text{kor}}(T) = \frac{P(T)}{E(T)} \cdot E(T_{\text{opt}})$$

Gleichung 4-12

$P_{\text{kor}}(T)$ = korrigierte Abbaurate bei der Temperatur T [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ]

$P(T)$ = gemessene Abbaurate bei der Temperatur T [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ]

$E(T)$  = gemessenen Aktivität der Lipase bei der Temperatur T [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]

$E(T_{\text{opt}})$ = gemessenen Aktivität der Lipase bei deren Temperaturoptimum  $T_{\text{opt}}$  [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]

In Tabelle 4-10 sind die gegenüber flüssigen Ölen gemessenen Aktivitäten der Lipase aus *Candida cylindracea* und *Pseudomonas species* [MARTEN 2000] und der Hydrolase aus *Thermomomsonpora fusca* [MARTEN 2000] zusammengestellt.

Tabelle 4-10: Temperaturabhängige Aktivitäten der Lipasen (Die Werte für PsL und TfH aus MARTEN 2000).

Lipase/Öl	T [°C]	Aktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]	Aktivität <sup>a)</sup> [%]
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i> / Triolein und Triacetin	30	0,64	74,48
	35	0,70	81,08
	40	0,79	91,72
	45	0,86	100,00
	50	0,46	53,26
	55	0,33	38,88
Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> / Adipinsäuredibutylester	30	4,56	54,33
	35	5,49	65,33
	40	6,52	77,67
	45	7,73	92,00
	50	8,40	100,00
	55	7,64	91,00

Fortsetzung von Tabelle 4-10:

Lipase/Öl	T [°C]	Aktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]	Aktivität <sup>a)</sup> [%]
Hydrolase aus <i>Thermomonospora fusca</i> / Adipinsäuredibutylester	37	5,54	43,07
	50	9,62	74,82
	55	11,57	90,05
	60	12,85	100,00
	63	12,39	96,47
	65	10,44	81,26
	68	7,39	57,52
	70	5,04	39,18

<sup>a)</sup> Aktivität bei dem Temperaturoptimum als 100% gesetzt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Vorauswahl geeigneter Enzyme

Für die Untersuchungen zum Bioabbau von Polyester-Nanopartikeln wird ein Labortest mit esterspaltenden Enzymen (Lipasen) verwendet, bei dem bei Messungen an Polymerfilmen bereits gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten worden waren [MARTEN 2000]. Zunächst war es notwendig, eine für die Untersuchungen geeignete Lipase auszuwählen. In der Literatur ist der Abbau von Polyestern mit unterschiedlichen Hydrolasen (Lipasen, Esterasen, etc.) bereits beschrieben. In Tabelle 5-1 ist eine kurze Zusammenstellung einiger polyesterspaltender Enzyme aus verschiedenen Veröffentlichungen aufgelistet.

Tabelle 5-1: In der Literatur beschriebene polyesterspaltende Enzyme

Enzym	hydrolysierte Polyester	Quelle
Lipase aus <i>Aspergillus niger</i> (AnL)	SP 2/6, SP 3/6, SP 4/6 Polyester, Polyesterurethan, Polyestercarbonate, Polyesteramide,	DARBY und KAPLAN 1968 KOCH et al. 1998
Lipase AK	SP 4/4, Gummi/SP 4/4-Blend	KHAN et al. 1999
Lipase aus <i>Candida antartica</i> (CaL)*	PCL Polyester, Polyesterurethan, Polyestercarbonate, Polyesteramide,	KOBAYASHI et al. 2000 KOCH et al. 1998
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i> (CcL)* (= <i>Candida rugosa</i> )	BASu x:y SP 2/6; PCL PCL Poly(tetramethylene carbonate), PCL	NIKOLIC und DJONLAGIC 2001 TOKIWA und SUZUKI 1977 b) NAKAYAMA et al. 1998 SUYAMA und TOKIWA 1997
Lipase aus <i>Chromobacterium viscosum</i> (CvL)	Poly(tetramethylene carbonate), PCL	SUYAMA und TOKIWA 1997
Lipase aus <i>Mucor miehei</i> (MmL)*	Polyester, Polyesterurethan, Polyestercarbonate, Polyesteramide,	KOCH et al. 1998
Lipase aus <i>Porcine pancreas</i> (PpL)*	Poly(tetramethylene carbonate), PCL	SUYAMA und TOKIWA 1997

Fortsetzung von Tabelle 5-1:

Enzym	hydrolysierte Polyester	Quelle
Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PfL)*	PCL	SUYAMA und TOKIWA 1997
Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> (PsL)*	Poly(tetramethylene carbonate), PCL aliphatische Homopolyester, aliphatisch-aromatische Copolyester	SUYAMA und TOKIWA 1997 MARTEN 2000
Lipase aus <i>Rhizopus arrhizus</i> (RaL)	PCL SP 2/4, SP 4/6, SP 6/6, PCL	NAKAYAMA et al. 1998 TOKIWA et al. 1990
Lipase aus <i>Rhizopus delemar</i> (RdL)	SP 3/4 SP 3/6, SP 4/6 PCL SP 2/4, SP 4/6, SP 6/6, PCL	WALTER et al. 1995 WALTER 1996 NAKAYAMA et al. 1998 TOKIWA et al. 1990
Hydrolase aus <i>Thermomonospora Fusca</i> (TfH)	BTA 40:60 BTA 40:60, BTA 60:40, PHB, SP 3/13, Bionolle	KLEEGERG et al. 1998 KLEEGERG 1999
Proteinase K*	PLA PLA PLA, PCL	LI et al. 2000 NAGATA et al. 1998 a) WANG et al. 1998
PHB-Depolymerasen	PHB	JENDROSSEK 1998

\* Vorauswahl von Enzymen für weitere Untersuchungen

Um ein geeignetes Enzym für die Untersuchungen an Polyester-Nanopartikeln auszuwählen, wurde aus den in Tabelle 5-1 zusammengestellten Enzymen nach folgenden Kriterien eine Vorauswahl getroffen:

- die Lipase musste kommerziell erhältlich sein, damit sie in ausreichender Menge zur Verfügung steht.
- sie sollte eine relativ hohe spezifische Aktivität besitzen, um die Proteinkonzentration im Testansatz und damit die Kosten so gering wie möglich zu halten.

Die in Frage kommenden Lipasen sind in Tabelle 5-1 mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Zusätzlich wurden noch die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* und *Aspergillus oryzae* in die mit Untersuchungen einbezogen.

Um eine Auswahl eines geeigneten Enzyms für die folgenden Abbauuntersuchungen treffen zu können, wurde von den oben genannten vorausgewählten Enzymen zunächst die Hydrolyseaktivität gegenüber einem polymeren Modellester aus 1,4-Butandiol und Adipinsäure (SP 4/6) bestimmt. Von diesem Polyester ist bereits bekannt, dass er gut biologisch abbaubar ist. Da der Abbau relativ schnell ist, können innerhalb eines kurzen Zeitraumes gesicherte Ergebnisse erhalten werden [MARTEN 2000].

Zur Bestimmung der Aktivität der vorausgewählten Enzyme gegenüber der Modellsubstanz SP 4/6 wurden Filme des Polyesters im Titrationsversuch eingesetzt. Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Versuche ohne Berücksichtigung der Optima der einzelnen Enzyme bei einer Temperatur von 40°C und einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt.

Die Wahl der Versuchstemperatur resultiert daraus, dass sie zum einen möglichst hoch gewählt werden sollte, da die Abbauraten der Polymere mit steigender Temperatur zunehmen [MARTEN 2000]. Zum anderen durfte die Versuchstemperatur die Schmelztemperaturen der später zu untersuchenden Polymere nicht überschreiten (der Schmelzpunkt von z.B. SP 3/6 liegt bei 42°C), da diese sonst schmelzen würden. Bei der Auswahl des pH-Wertes wurde darauf geachtet, dass die rein chemische Hydrolyse des Polyesters SP 4/6 möglichst gering ist und dass der pH-Wert im Bereich der pH-Optima der Lipasen liegt, d.h. zwischen 5-9 [RÖMPP 1998]. Aus diesen Gründen wurden die Versuche bei einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt.

In allen Tests wurde die gleiche Proteinmenge an Enzym eingesetzt (1 mg Protein pro Test). Die gleichen Massen an Feststoff einzusetzen erschien nicht sinnvoll, da sich die Proteingehalte der Enzymformulierungen stark unterscheiden (die Feststoffe enthalten neben dem Enzym noch stabilisierende Salze, etc.). Eine dritte Möglichkeit, gleiche spezifische Aktivitäten (bezogen auf Triglyceride wie z.B. Triolein oder Triacetin) pro Abbauversuch einzusetzen, war nicht möglich, da sich die Aktivitäten der Lipasen zu stark unterscheiden. So hätten z.B. von der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* bei 100 units (1 unit produziert 1 µmol Ölsäure pro Minute aus Triolein bei 40°C und pH 8,0) pro Ansatz nur  $3,2 \cdot 10^{-2}$  mg und von der Lipase aus *Candida antarctica* hingegen 33 mg eingesetzt werden müssen. Diese Mengenverhältnisse sind in praktisch experimenteller Hinsicht nicht realisierbar.

In Abb. 5-1 sind die Ergebnisse des Vergleiches des Abbaus von SP 4/6-Filmen durch die verschiedenen Enzyme dargestellt.

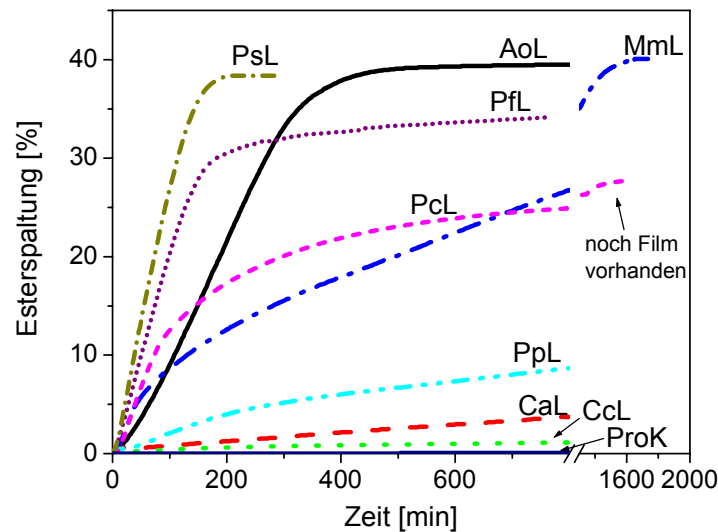


Abb. 5-1: Abbau von zwei SP 4/6-Filmen ( $\varnothing=0,9$  cm, Dicke=110  $\mu\text{m}$ ,  $A=2,54$   $\text{cm}^2$ ) mit unterschiedlichen Enzymen bei 40°C, pH 7.0, 1 mg Protein. (AoL: Lipase aus *Aspergillus oryzae*, CaL: Lipase aus *Candida antarctica*, CcL: Lipase aus *Candida cylindracea*, MmL: Lipase aus *Mucor miehei*, PpL: Lipase aus *Porcine pancreas*, PfL: Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, PcL: Lipase aus *Pseudomonas cepacia*, PsL: Lipase aus *Pseudomonas species*, ProK: Proteinase K).

Bei der enzymatischen Hydrolyse des Modellpolyesters SP 4/6 wird ein Plateau bei einer maximalen Spaltung von nur 40% der vorhandenen Estergruppen erreicht (Abb. 5-1). Dieses Plateau lässt sich nicht mit einer Abnahme der Enzymaktivität erklären, denn eine erneute Enzymzugabe bewirkt keine weitere Esterspaltung. Da optisch in dem Reaktionsgefäß beim Erreichen des Plateaus kein Polymerfilm mehr zu erkennen war, kann davon ausgegangen werden, dass sich die restlichen Esterbindungen in wasserlöslichen Oligomeren befinden, die dann von der Lipase nicht weiter gespalten werden können. Es ist aus der Literatur bekannt [JÄGER et al. 1994], dass Lipasen, im Gegensatz zu Esterasen, keine Aktivität gegenüber in Wasser gelösten Substraten zeigen (siehe Abb. 5-2).

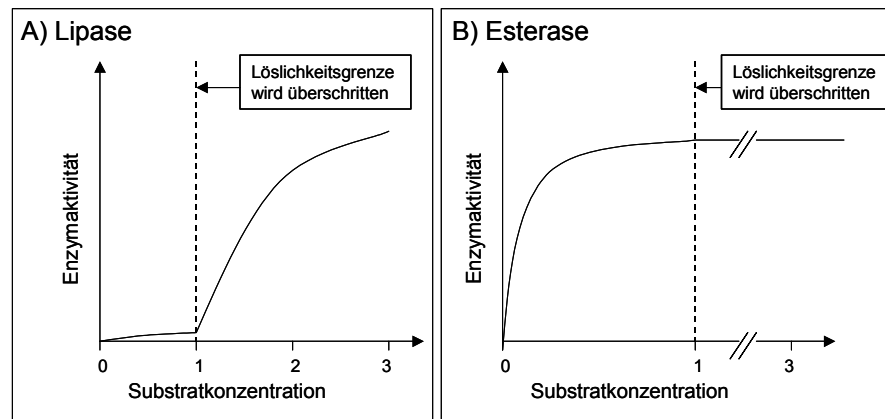


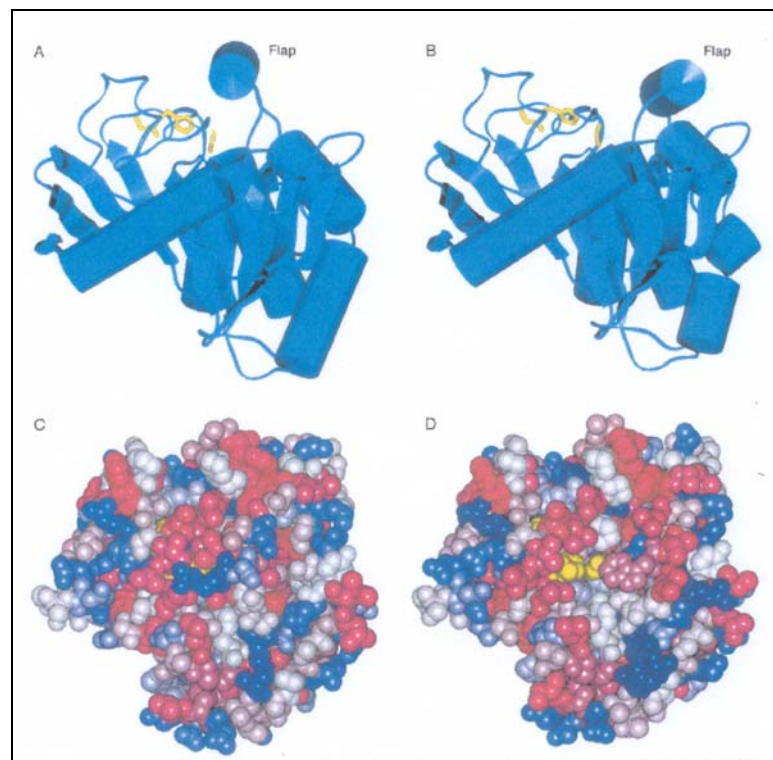
Abb. 5-2: Hydrolyse von Triacetin mit der Lipase aus *Porcine Pancreas* (A) und der Esterase aus *Pferdeleber* (B) [VERGER und DE HAAS 1976].

Lipasen benötigen zur Aktivierung ihres katalytischen Zentrums eine hydrophobe Oberfläche [VERGER und DE HAAS 1976]. Dieser Vorgang wird als „interfacial activation“ beschrieben und beinhaltet eine Konformationsänderung des Enzyms.

Das aktive Zentrum von Lipasen ist unter Teilen eines aus hydrophoben Seitenketten gebildeten Peptidgerüsts, dem sogenannten Deckel, verborgen (vgl. Abb. 5-3 A,C). Erst wenn eine Lipase an einer Grenzfläche adsorbiert, wird der Deckel durch Konformationsänderungen geöffnet (vgl. Abb. 5-3 B,D) und das aktive Zentrum mit seiner katalytischen Triade wird für das Substrat zugänglich [SCHMID und VERGER 1998].

Abb. 5-3:

Struktur der Lipase aus *Mucor miehei* in der geschlossenen Form (A,C) und in der geöffneten Form (B,D). A und B (Seitenansicht): die katalytische Triade (gelb). C und D (Aufsicht): „space-filling model“, Farben nach abnehmender Polarität (dunkelblau-hellblau-weiss-hellrot-dunkelrot). Wenn sich der Deckel öffnet, dann wird das katalytische Zentrum (gelb) für das Substrat zugänglich (D), und die Region um das katalytische Zentrum wird polarer [SCHMID und VERGER 1998].



Ausgehend von den Erkenntnissen bezüglich des Aktivierungsmechanismus von Lipasen mittels einer hydrophoben Oberfläche („interfacial activation“) kann geschlussfolgert werden, dass Lipasen die Esterbindungen in der Polymerkette nur solange spalten können, wie die Intermediate noch nicht wasserlöslich sind und an der Polyesteroberfläche adsorbiert sind. Haben sich die Intermediate erst einmal in die wässrige Phase abgelöst, treffen sie dort keine aktiven Lipasen mehr und werden nicht weiter gespalten. Folglich ist die Höhe des Plateaus abhängig von der Löslichkeit der Intermediate (abgetrennte Oligomere). So werden im Gegensatz zu SP 4/6, wo 40% aller vorhandenen Esterbindungen gespalten wurden, bei der enzymatischen Hydrolyse eines aliphatischen Homopolyesters aus 1,3-Propandiol und Bernsteinsäure (SP 3/4) nur 25% aller vorhandenen Esterbindungen gespalten, was darauf zurückzuführen ist, dass im Vergleich zu SP 4/6 bereits länger-kettige Oligomere (Tetramere) des SP 3/4 wasserlöslich sind, und folglich von der Lipase nicht weiter gespalten werden können.

Die Aktivität der einzelnen Enzyme gegenüber dem Polyester ergibt sich jedoch nicht aus der Plateauhöhe, sondern der Anfangssteigung der Tritrationskurven. Unter der Voraussetzung, dass die gesamte Polymeroberfläche mit Enzym belegt ist ( $q_{E\max}$ ) und die Abbaugeschwindigkeit proportional zur Dichte der Esterbindungen (s. Tabelle 8-6 im Anhang) und der Oberfläche ist, lässt sich diese Abbaugeschwindigkeit der Filme mit Gleichung 5-1 beschreiben.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = kq_{E\max}\rho_{EB}A = K_F \quad \text{Gleichung 5-1}$$

- $n_{EB}$  = Anzahl der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB}$ ]
- $t$  = Zeit [min]
- $k$  = Geschwindigkeitskonstante [ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1} \text{mg}_E^{-1}$ ]
- $q_{E\max}$  = adsorbierte Enzymmenge [ $\text{mg}_E \text{cm}^{-2}$ ]
- $\rho_{EB}$  = Dichte der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB} \text{cm}^{-3}$ ]
- $A$  = Oberfläche [ $\text{cm}^2$ ] = 2,54  $\text{cm}^2$
- $K_F$  = Konstante [ $\text{mol}_{EB} \text{min}^{-1}$ ]

Da sich die Oberfläche während des gesamten Abbaus nicht ändert, ist die Abbaugeschwindigkeit folglich bis zum vollständigen Abbau der Polymerfilme konstant, was auch direkt aus der linearen Steigung der Abbaukurven in Abb. 5-1 zu erkennen ist. Die Abnahme der Abbaugeschwindigkeit bei einigen Lipasen, wie z.B. bei der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* lässt sich anhand einer Aktivitätsabnahme der Lipase zu erklären.

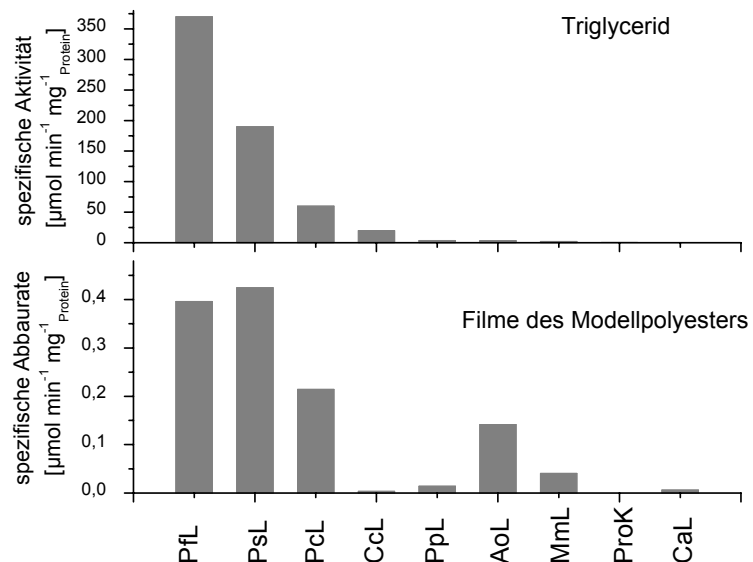
Eine Ausnahme bildet die Lipase aus *Aspergillus oryzae*. Bei dieser Abbaukurve ist ein Wendepunkt zu erkennen, was z.B. durch eine kooperative Wechselwirkung des Substrates mit einem oligomeren Enzym (kooperative Enzymkinetik oder Hill-Kinetik) erklärt werden könnte.



Aus Abb. 5-1 ist ersichtlich, dass sich die Aktivitäten der untersuchten Enzyme gegenüber SP 4/6 signifikant unterschieden. In Abb. 5-4 ist ein Vergleich dieser Hydrolysegeschwindigkeiten mit der spezifischen Aktivität der Enzyme gegenüber Triglyceriden als nicht-polymere Ester dargestellt.

Abb. 5-4:

Enzymaktivität  
verschiedener Enzyme  
gegenüber SP 4/6-Filmen  
und Triglyceriden (Triolein  
und Triacetin, emulgiert) bei  
40°C und pH 7.0 bezogen  
auf die eingesetzte  
Proteinmenge.



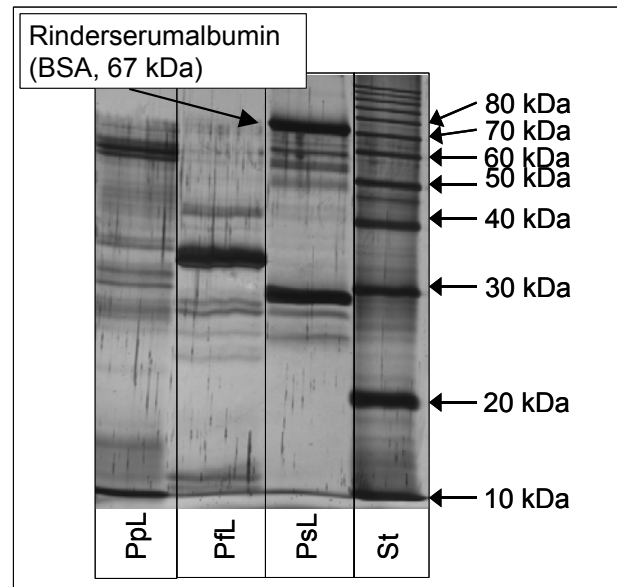
Tendenziell ist die Aktivität der Enzyme bezüglich der Triglyceride auf die Abbauraten der Filme übertragbar. Enzyme, die eine hohe Triglycerid-Aktivität aufweisen, bauen auch den Modellpolyester schnell ab. Hingegen spalten Enzyme mit einer geringeren Aktivität gegenüber dem Öl die Esterbindungen des Polyesters auch nur sehr langsam. Ausnahmen bilden hierbei die Lipase aus *Aspergillus oryzae* und die Lipase aus *Mucor miehei*, welche eine überproportionale Aktivität bezüglich des Polyesters aufweisen.

Die unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten der Lipasen lassen sich nicht mit deren pH- und Temperaturoptima korrelieren, denn z.B. für die Lipase aus *Mucor miehei* liegen im Abbautest optimale Bedingungen vor (pH-Optimum: 7,0 und Temperaturoptimum: 40°C) und dennoch zeigt diese Lipase nur eine relativ schwache spezifische Aktivität gegenüber den Substraten.

Zusätzlich kann die Reinheit der Enzymformulierungen als Grund für die beobachteten Unterschiede der spezifischen Aktivitäten diskutiert werden, da die Reinheit der verschiedenen Hydrolasen in den Formulierungen sehr unterschiedlich ist. Dies konnte durch SDS – gelelektrophoretische Untersuchungen gezeigt werden. Laut Herstellerangabe ist z.B. der Formulierung der Lipase aus *Pseudomonas species* auch gezielt Rinderserumalbumin zugesetzt (SDS-Gel s. Abb. 5-5).

Abb. 5-5:

SDS-PAGE zur Bestimmung der Molekulargewichte und der Reinheit der Enzymformulierung der Lipase aus *Porcine pancreas*, aus *Pseudomonas fluorescens* und aus *Pseudomonas species* (weitere Gele s. Kapitel 4.1)



Da aber z.B. die Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens* und aus *Porcine pancreas* trotz vergleichbarer Reinheit bezüglich der Enzyme dennoch große Unterschiede in der Hydrolysegeschwindigkeit des Modellpolyesters und des Öls aufweisen, sind auch substratspezifische Faktoren für die Interpretation der beobachteten Unterschiede einzubeziehen.

Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität sowohl gegenüber Triglyceriden als auch gegenüber dem Modellpolyester wurden zunächst die Lipasen aus *Pseudomonas species* und aus *Pseudomonas fluorescens* für die nachfolgenden Untersuchungen zur Abbaugeschwindigkeit von Polyester-Nanopartikeln in Betracht gezogen. Aufgrund der Tatsache, dass zum einen mit der Lipase aus *Pseudomonas species* schon zahlreiche Untersuchungen an Polyesterfilmen durchgeführt wurden [MARTEN 2000], und deshalb ein direkter Vergleich mit bereits existierenden Daten möglich war, und dass zum anderen mit der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* eine deutliche Abweichung von dem sonst üblicherweise erreichten Plateau bei der Hydrolyse von ca. 40 % Esterspaltung zu beobachten war, wurde für die Experimente mit Polyester-Nanopartikeln zunächst die Lipase aus *Pseudomonas species* präferiert

Die Charakterisierung des Temperatur- und pH-Optimums der Lipase aus *Pseudomonas species* sind im Anhang in Abb. 8-1 bis Abb. 8-3 zusammengefasst.

## 5.2 Abbau von Polyester-Nanopartikeln

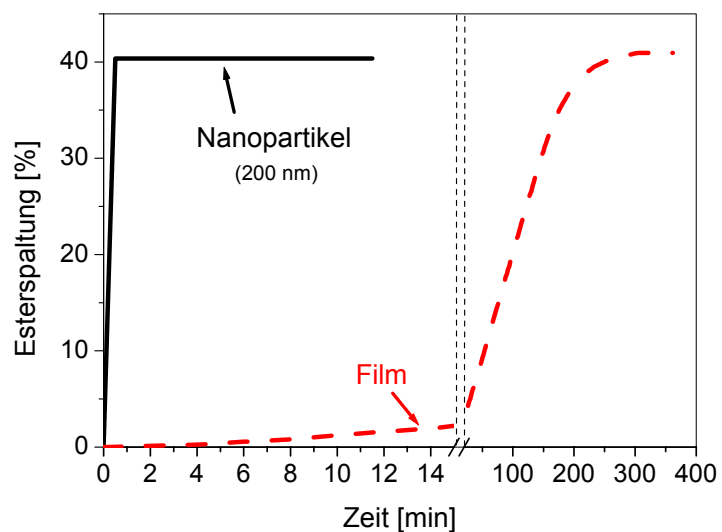
Zunächst stellte sich nun die grundsätzliche Frage, in welchem Umfang eine Beschleunigung des Abbaus von Polyestern durch die Verwendung von Polyester-Nanopartikeln erreicht werden kann.

Erste Versuche zum Abbau von Polyester-Nanopartikeln wurden von WU und GAN (1998) publiziert. Sie untersuchten den enzymatischen Abbau von Poly(-caprolacton)-Nanopartikeln mit der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* mittels Lichtstreuung. Der Abbau bei Verwendung von Nanopartikeln ( $\varnothing=100$  nm) war hier ca. um den Faktor  $10^3$  schneller als bei dünnen Filmen des gleichen Polyesters.

Erste eigene sondierende Untersuchungen zum Abbauverhalten von Nanopartikeln wurden anhand einer Modellverbindung, einem aliphatischen Homopolyester aus 1,4-Butandiol und Adipinsäure (SP 4/6), durchgeführt. Die gemessenen enzymatischen Abbaukurven von Nanopartikeln ( $\varnothing=200$  nm) und von einem Film (Dicke 110  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing=0,9$  cm) des Modellpolyester SP 4/6 mit der Lipase aus *Pseudomonas species* sind in Abb. 5-6 dargestellt.

Abb. 5-6:

Abbau von SP 4/6-Nanopartikeln ( $m=0,7$  mg,  $\varnothing=200$  nm,  $A=161$  cm<sup>2</sup>) und von einem SP 4/6-Film ( $m=10$  mg,  $\varnothing=0,9$  cm,  $A=1,27$  cm<sup>2</sup>) mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C und pH 7,0.



Im Vergleich zu einem SP 4/6-Film konnte mit Nanopartikeln für den Abbau mit der Lipase aus *Pseudomonas species* eine signifikante Steigerung der Abbaurrate erzielt werden ( $AR_{enz}(\text{Film})=0,17$   $\mu\text{mol}_{\text{Ester}}/\text{min}$ ;  $AR_{enz}(\text{Nanopartikel})=4,62$   $\mu\text{mol}_{\text{Ester}}/\text{min}$ ). Die durch den Abbau der Nanopartikel hervorgerufene pH-Änderung (Abbau der Suspension innerhalb weniger Sekunden) war dermaßen schnell, dass das verwendete Titrationssystem nicht in der Lage war, quantitativ verwertbare Daten zu liefern. Die reale Abbaugeschwindigkeit der Nanopartikel wird somit noch größer sein als die gemessenen  $AR_{enz}(\text{Nanopartikel})=4,62$   $\mu\text{mol}_{\text{Ester}}/\text{min}$ .

Der Abbau von SP 4/6-Nanopartikeln mit der Lipase aus *Pseudomonas species* erwies sich als zu schnell, um mit dem verwendeten Testsystem quantitativ auswertbare Daten zu erhalten. Aus diesem Grund sollte eine Lipase mit einer geringeren Aktivität gegenüber den SP 4/6-Nanopartikeln, für die folgenden systematischen Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Enzymkonzentration oder der verfügbaren Oberfläche auf die Abbaugeschwindigkeit ausgewählt werden.

Hierzu wurde die Aktivität der in Tabelle 5-1 vorgestellten Enzyme gegenüber SP 4/6-Nanopartikeln ( $\varnothing=200$  nm) im Titrationsversuch bestimmt (Abb. 5-7). Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Versuche wieder (s. Kapitel 5.1) ohne Berücksichtigung der Optima der einzelnen Enzyme bei einer Temperatur von 40°C und einem pH-Wert von 7.0 durchgeführt. Ebenfalls wurde bei allen Tests die gleiche Proteinmenge an Enzym eingesetzt (1 mg Protein pro Test).

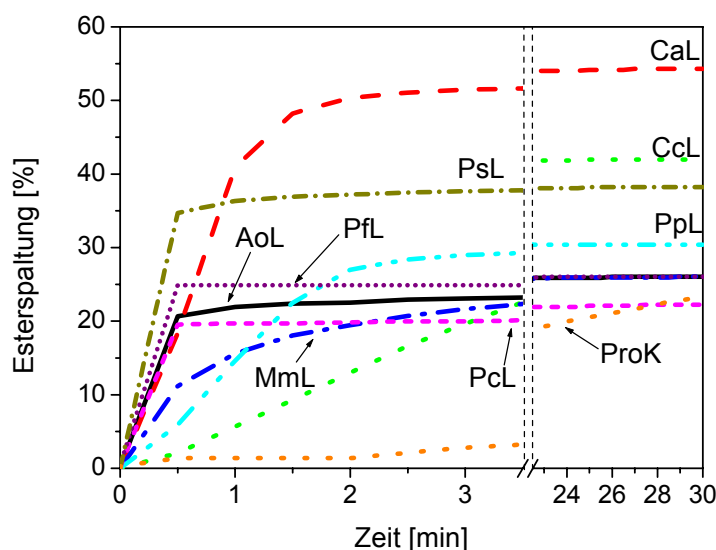


Abb. 5-7: Abbau von SP 4/6-Nanopartikeln ( $\varnothing=200$  nm,  $m=0,7$  mg) mit unterschiedlichen Enzymen bei 40°C, pH 7.0 und gleicher Proteinmenge (1 mg). (AoL: Lipase aus *Aspergillus oryzae*, CaL: Lipase aus *Candida antarctica*, CcL: Lipase aus *Candida cylindracea*, MmL: Lipase aus *Mucor miehei*, PpL: Lipase aus *Porcine pancreas*, Pfl: Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, Pcl: Lipase aus *Pseudomonas cepacia*, PsL: Lipase aus *Pseudomonas species*, ProK: Proteinase K).

Alle Enzyme hydrolysieren die Polyester-Nanopartikel deutlich schneller als die Polyester-Filme (s. Kapitel 5.1). Für alle Enzyme konnte schon nach spätestens 15 Minuten keine weitere Spaltung von Esterbindungen mehr beobachtet werden. Bei Erreichen der Plateauphase waren alle Suspensionen völlig klar geworden und die Polyester-Partikel vollständig in wasserlösliche Spaltprodukte überführt.

Im Gegensatz zu der Hydrolyse der Polyester-Filme, wo einheitlich 40% aller vorhandenen Esterbindungen gespalten wurden, variieren die maximalen Esterspaltungen bei den Polyester-Nanopartikeln stark. Die erreichten maximalen Esterspaltungen liegen fast alle zwischen 20% (Lipase aus *Pseudomonas cepacia*) und 40% (Lipase aus *Candida cylindracea*). Eine Ausnahme bildet die Lipase aus *Candida antarctica*, die 55% der vorhandenen Esterbindungen hydrolysiert. Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu anderen Lipasen die Lipase aus *Candida antarctica* auch in der Lage ist wasserlösliche Oligomere zu spalten („Esteraseaktivität“), was bereits in der Literatur beschrieben ist. Laut CYGLER und SCHRAG (1999) zeigt die Lipase aus *Candida antarctica* (Typ B) keine Grenzflächenaktivierung und die damit verbundene Konformationsänderung. Gestützt wird diese Aussage von SCHMID und VERGER (1998). Sie publizierten, dass nicht alle Lipasen dem Phänomen der „interfacial activation“ unterliegen. So besitzen die Lipasen aus *Pseudomonas glumae* und *Candida antarctica* (Typ B) zwar den sogenannten „Deckel“, unterliegen aber nicht der „interfacial activation“. Dennoch scheint die verwendete Lipase aus *Candida antarctica* nur eine schwache Esteraseaktivität zu besitzen, denn sonst wäre eine Spaltung von 100% und nicht nur von 55% aller vorhandenen Esterbindungen zu erwarten.

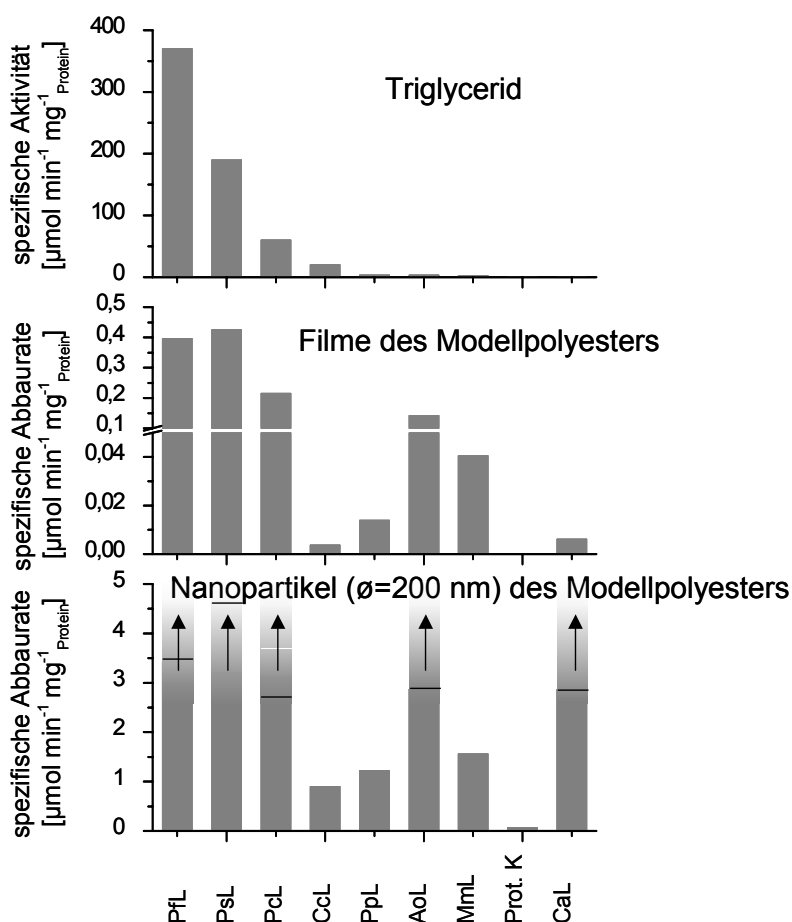
Bei den meisten anderen untersuchten Lipasen liegt das Plateau der maximal erreichten Esterspaltung unterhalb von 40%. Diese unterschiedlichen Plateaus könnten einerseits darin begründet liegen, dass die gebildeten Säuren abgepuffert und so titrimetrisch nicht erfasst wurden oder dass die Ablösung längererkettiger Oligomere durch oberflächenaktive Substanzen, die möglicherweise in den Enzymformulierungen als Stabilisatoren eingesetzt werden, ermöglicht wird, und somit mehr Estergruppen in löslichen Spaltprodukten vorliegen, die einer weiteren Spaltung durch die Lipasen nicht zugänglich sind. Eine signifikante Pufferwirkung der Enzymformulierungen konnte nicht bestätigt werden (s. Abb. 8-4 im Anhang). Zur Klärung der Frage, inwieweit oberflächenaktive Substanzen die Löslichkeit längererkettiger Oligomere erhöhen und damit die maximal erreichte Esterspaltung herabsetzen können, wurden unterschiedliche Mengen SP 4/6-Nanopartikel ( $\varnothing=200$  nm) exemplarisch mit der Lipase aus *Aspergillus oryzae* (1 mg Protein pro Test) abgebaut (s. Abb. 8-5 im Anhang). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die maximal erreichte Esterspaltung (Plateau) mit steigender Polyestermasse ansteigt, bis ein Maximalwert von 40% Esterspaltung erreicht wurde. Dieser Maximalwert bleibt dann, unabhängig von einer weiteren Steigerung der Polyestermasse, konstant. Diese Beobachtung ließe sich dadurch erklären, dass nur geringe Mengen oberflächenaktiver Substanzen in der Enzymformulierung vorhanden sind, die auch eine begrenzte Menge an längeren Oligomeren maskieren können. Bei einer geringen Gesamtmasse an abzubauendem Polymer fällt der Anteil dieser „frühzeitig“ abgelösten Spaltprodukte mehr ins Gewicht als bei größeren Polymermassen, wo

nach Verbrauch der oberflächenaktiven Formulierungsbestandteile der größte Teil der Spaltprodukte „normal“ von der Polyesteroberfläche abgelöst wird. Über Art und Menge an oberflächenaktiven Zusätzen machen die Hersteller keine genauen Angaben.

Wie ebenfalls in Abb. 5-7 ersichtlich ist, variieren, neben den oben diskutierten Unterschieden in den Plateaus, die Hydrolysegeschwindigkeiten (ermittelt aus den Anfangssteigungen der Kurven) der einzelnen Enzyme deutlich. In Abb. 5-8 ist ein Vergleich dieser Hydrolysegeschwindigkeiten mit der Hydrolysegeschwindigkeit der Filme und mit der spezifischen Aktivität der Enzyme (Aktivität gegenüber den Triglyceriden Triolein und Triacetin; s. Kapitel 5.1) dargestellt.

Abb. 5-8:

Zusammenfassung der Hydrolysegeschwindigkeiten bei 40°C und pH 7,0 unterschiedlicher Substrate mit verschiedenen Enzymen. (Die Pfeile deuten an, dass es sich bei diesen Abbauraten der Nanopartikel [durch die schwarze Linie in den Balken gekennzeichnet] um Minimalwerte handelt. Die realen Abbauraten sind größer.)



Die Hydrolysegeschwindigkeit des Modellpolyesters konnte bei allen Enzymen durch die Verwendung von Nanopartikeln stark beschleunigt werden (zu beachten sind die unterschiedlichen Ordinatenskalierungen in Abb. 5-8). Wobei Enzyme, die eine hohe Hydrolyserate bei den Filmen zeigen, auch die Esterbindungen in den Nanopartikeln sehr schnell hydrolysieren. Eine Ausnahme bildet auch hier wieder die Lipase aus *Candida antarctica*.

Aus den Abbautests an den SP4/6-Nanopartikeln lässt sich eine Auswahl eines geeigneten Enzyms für die nachfolgenden systematischen Untersuchungen treffen. In Bezug auf die erzielten Abbauraten erschienen grundsätzlich die Lipasen aus *Candida cylindracea*, *Mucor meihei* und *Porcine pancreas* geeignet für verlässliche quantitative Messungen, wobei aber nur die Lipase aus *Candida cylindracea* die maximale Esterspaltung von ca. 40 % erreichte.

Somit wurde für die folgenden quantitativen Untersuchungen zum enzymatischen Abbau an Nanopartikeln aliphatischer Homopolyester die Lipase aus *Candida cylindracea* ausgewählt. Mit dieser Lipase liegt ein System vor, mit dem sowohl die Abbaugeschwindigkeit von Filmen als auch von Nanopartikeln unter vergleichbaren Testbedingungen untersucht werden kann. Die Abbaurate der Filme ist mit  $3,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol min}^{-1}$  ( $14 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) zwar sehr gering, aber dennoch messbar.

Eine Charakterisierung der Lipase aus *Candida cylindracea* hinsichtlich des Temperatur- und pH-Optimum ist im Anhang in Abb. 8-1 bis Abb. 8-3 zusammengefasst.

### 5.3 Enzymkinetik

Bei der Verwendung von sphärischen Partikeln bei den Abbauuntersuchungen ist, da es sich beim enzymatischen Polymerabbau um einen Oberflächenprozess handelt, mit einer Reduzierung der Abbaugeschwindigkeit mit abnehmenden Partikelradien und damit abnehmender Polyesteroberfläche zu rechnen. Unter der Voraussetzung dass das Enzym im Überschuss vorhanden ist und die verfügbare Polymeroberfläche für den Abbau nutzen kann, lässt sich die Abbaugeschwindigkeit analog zu Gleichung 5-1 anhand von Gleichung 5-2 beschreiben.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = kq_{E\max}\rho_{EB}A$$

Gleichung 5-2

$n_{EB}$  = Anzahl der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB}$ ]

$t$  = Zeit [min]

$k$  = Geschwindigkeitskonstante [ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1} \text{mg}_E^{-1}$ ]

$q_{E\max}$  = adsorbierte Enzymmenge [ $\text{mg}_E \text{cm}^{-2}$ ]

$\rho_{EB}$  = Dichte der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB} \text{cm}^{-3}$ ]

$A$  = verfügbare Oberfläche [ $\text{cm}^2$ ]

Im Gegensatz zum Abbau der Filme kann bei dem Abbau der Nanopartikel nicht von einer konstanten Oberfläche  $A$  ausgegangen werden. Die Oberfläche ist in Abhängigkeit von dem Partikeldurchmesser  $d_p$  zu betrachten. Unter der Annahme einer monodispersen Partikelgrößenverteilung berechnet sich die Gesamtoberfläche der Polymernanopartikel nach Gleichung 5-3.

$$A = \sum_{N_i=1}^{N_i=N_p} A_i = N_p A_p = N_p \pi d_p^2$$

Gleichung 5-3

- $N_i$  = Anzahl der Partikel mit dem Durchmesser  $i$   
 $N_p$  = Gesamtanzahl der Partikel  
 $A_i$  = Oberfläche eines Partikels  $i$  [cm<sup>2</sup>]  
 $A_p$  = Oberfläche eines Partikels [cm<sup>2</sup>]  
 $d_p$  = Durchmesser der Partikel [cm]

Damit ist die Abbaugeschwindigkeit gegeben durch Gleichung 5-4.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = kq_{E \max} \rho_{EB} N_p \pi d_p^2$$

Gleichung 5-4

Die Anzahl der Esterbindungen lässt sich wie folgt beschreiben

$$n_{EB} = \frac{n_{EB/Mrep} m_p}{M_{Rep}} = \frac{n_{EB/Mrep}}{M_{Rep}} \rho_p \sum_{N_i=1}^{N_i=N_p} V_{pi}$$

Gleichung 5-5

- $m_p$  = Masse des Polymeren [g]  
 $n_{EB/Mrep}$  = Anzahl der Esterbindungen pro Repetiereinheit  
 $M_{Rep}$  = Molmasse einer Repetiereinheit [g mol<sup>-1</sup>]  
 $\rho_p$  = Dichte des Polymeren [g cm<sup>-3</sup>]  
 $V_{pi}$  = Volumen des Partikels  $i$  [cm<sup>3</sup>]

Bei einer monodispersen Partikelgrößenverteilung ergibt sich aus Gleichung 5-5:

$$n_{EB} = \frac{n_{EB/Mrep}}{M_{Rep}} \rho_p N_p V_p = \frac{n_{EB/Mrep} \rho_p N_p}{M_{Rep}} \frac{1}{6} \pi d_p^3$$

Gleichung 5-6

$V_p$  = Gesamtvolumen der Partikel [cm<sup>3</sup>]

Die Abbaurrate kann dann als Abnahme der Esterbindungen mit der Zeit durch

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = -\frac{n_{EB/Mrep} \rho_p N_p}{M_{Rep}} \frac{1}{2} \pi d_p^2 \frac{d(d_p)}{dt}$$

Gleichung 5-7

ausgedrückt werden. Aus der Gleichsetzung von Gleichung 5-4 und Gleichung 5-7 folgt

$$-\frac{d(d_p)}{dt} = \frac{2kq_{E \max} \rho_{EB} M_{Rep}}{n_{EB/Mrep} \rho_p} = K$$

Gleichung 5-8

und demnach ist die Abnahme des Partikeldurchmessers mit der Zeit konstant.



Die Bestimmung des bestimmten Integrals in den Grenzen  $d_0$  und  $d$ , bzw.  $t$  und  $t_0=0$  von Gleichung 5-8 liefert

$$\frac{d_p}{d_{p_0}} = 1 - Kt$$

Gleichung 5-9

$d_{p_0}$  = Partikeldurchmesser zur Zeit  $t=0$  [cm]

Da eine Bestimmung von  $d_p$  nicht möglich war, kann besser der Umsatz  $X$

$$X = \frac{V_{p_0} - V_p}{V_{p_0}} = 1 - \frac{V_p}{V_{p_0}} = 1 - \left( \frac{d_p}{d_{p_0}} \right)^3$$

Gleichung 5-10

$X$  = Umsatz

$V_{p_0}$  = Volumen eines Partikels zur Zeit  $t=0$  [cm<sup>3</sup>]

$V_p$  = Volumen eines Partikels zur Zeit  $t=t$  [cm<sup>3</sup>]

herangezogen werden.

Durch Einsetzen von Gleichung 5-9 in Gleichung 5-10 wird Gleichung 5-11 erhalten.

$$X = 1 - (1 - K \cdot t)^3$$

Gleichung 5-11

$$\Leftrightarrow (1 - X)^{\frac{1}{3}} = 1 - K \cdot t$$

Gleichung 5-12

In Abb. 5-9 sind experimentelle Abbaukurven am Beispiel von drei verschiedenen Homopolyestern (aliphatische Homopolyester aus 1,4-Butandiol und Adipinsäure (SP 4/6), aus 1,4-Butandiol und Korksäure (SP 4/8) und aromatischer Homopolyester aus 1,5-Pentandiol und Terephthalsäure PPeT) im Vergleich mit dem in Gleichung 5-12 beschriebenen, theoretischen, der abnehmenden Oberfläche der Polymerkugeln Rechnung tragenden Abbauverlauf dargestellt. Der Abbau der aliphatischen Homopolyester wurde mit der Lipase aus *Candida cylindracea* und der des aromatischen Homopolyesters mit der Lipase aus *Pseudomonas species* durchgeführt.

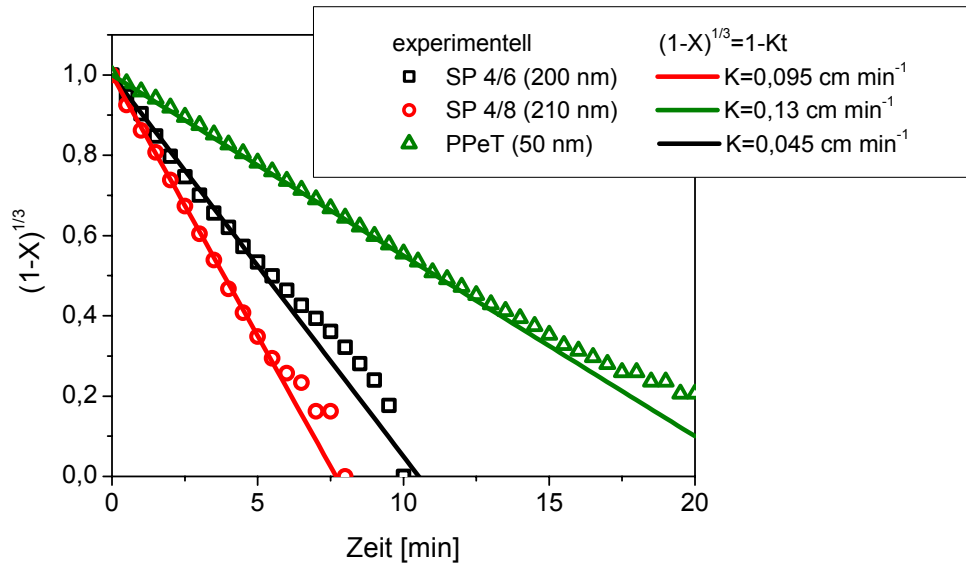


Abb. 5-9: Vergleich der experimentell ermittelten Abbaukurven aliphatischer Homopolyester (SP 4/6 und SP 4/8; Lipase aus *Candida cylindracea*) und eines aromatischen Homopolyesters (PPeT; Lipase aus *Pseudomonas species*) mit der nach Gleichung 5-12 berechneten Abbaukurve (Symbole: experimentell ermittelte Abbaukurven, Linien: berechnete Abbaukurven). Die Steigungen der Geraden entsprechen den dargestellten K-Werten.

Da bei der Berechnung von einer monodispersen Partikelgrößenverteilung ausgegangen wurde, d.h. einer Polydispersität der Partikel von  $PD < 0,05$ , kann die geringe Abweichung der Kurvenverläufe in Abb. 5-9 auf eine polydisperse Verteilung der Partikelgröße bei den realen Nanopartikel-Suspensionen zurückgeführt werden, deren Polydispersitäten bei  $PD \approx 0,1$  liegen (zur Definition der Polydispersität s. Kapitel 4.6.2).

Die Konstante K ergab sich aus den Steigungen der Geraden und ist laut Gleichung 5-8 definiert als

$$K = \frac{2kq_{E\max}\rho_{EB}M_{Rep}}{n_{EB/Mrep}\rho_p}$$

Gleichung 5-13

Bis auf k und  $q_{E\max}$  sind alle Werte bekannt, bzw. können näherungsweise angegeben oder berechnet werden (s. Tabelle 5-2), sodass  $k \cdot q_{E\max}$  nach Gleichung 5-14 berechnet werden kann.

$$kq_{E\max} = \frac{Kn_{EB/Mrep}\rho_p}{2\rho_{EB}M_{Rep}}$$

Gleichung 5-14

Tabelle 5-2: Daten zur Berechnung von  $kq_{E_{\max}}$ 

Polyester	SP 4/6	SP 4/8	PPeT
$\rho_{EB}^{a)}$ [ $\mu\text{mol}_{EB} \text{ cm}_{\text{solid}}^{-3}$ ]	12,98	11,39	11,09
$K$ [ $\text{cm min}^{-1}$ ]	0,095	0,130	0,045
$n_{EB/Mrep}$	2	2	2
$M_{rep}$ [ $\text{g mol}^{-1}$ ]	200,26	228,32	234,27
$\rho_p$ [ $\text{g cm}^{-3}$ ]	1,3	1,3	1,3
$k \cdot q_{E_{\max}}$ [ $\text{cm min}^{-1}$ ]	$47,51 \cdot 10^{-3}$	$64,99 \cdot 10^{-3}$	$22,52 \cdot 10^{-3}$

a) zur Abschätzung von  $\rho_{EB}$  s. Tabelle 8-6 im Anhang

Eine differenzierte Interpretation der Geschwindigkeitskonstanten der Abbaugeschwindigkeit  $k$  ist nicht möglich, da  $k$  und  $q_{E_{\max}}$  nicht getrennt bestimmt werden können.

Zur weiteren Verifizierung der Abbaukinetik wurde in die nach Gleichung 5-11 berechnete und die aus experimentellen Werten erhaltenen Abbaukurven in Abb. 5-10 dargestellt. Hierzu wurden die aus den Steigungen der Geraden in Abb. 5-9 ermittelten  $K$ -Werte verwandt.

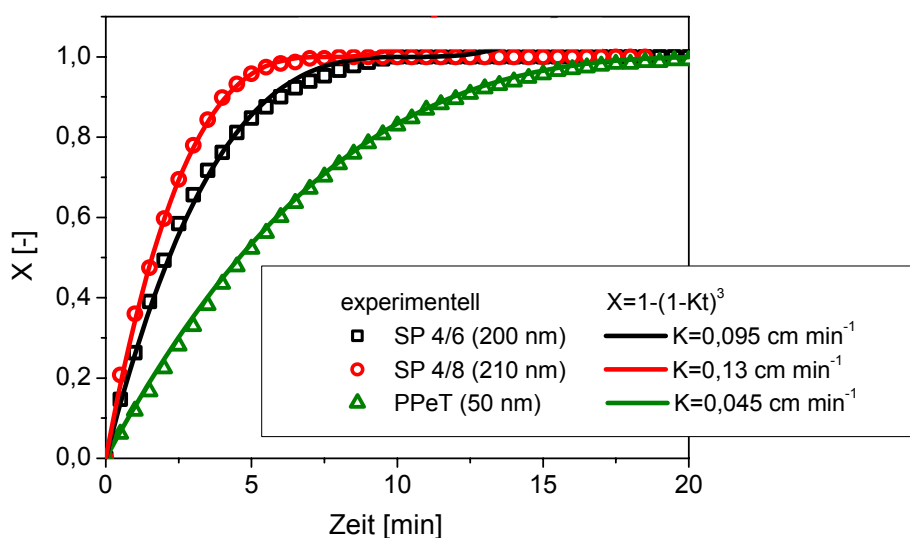


Abb. 5-10: Vergleich der experimentell ermittelten Abbaukurven aliphatischer Homopolyester (SP 4/6 und SP 4/8; Lipase aus *Candida cylindracea*) und eines aromatischen Homopolyesters (PPeT; Lipase aus *Pseudomonas species*) mit der nach Gleichung 5-11 berechneten Abbaukurve (Symbole: experimentell ermittelte Abbaukurven, Linien: berechnete Abbaukurven). Die  $K$ -Werte entsprechen den Steigungen der Geraden in Abb. 5-9.

Der Vergleich zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der theoretischen und experimentellen Kurven bzw. Geraden. Die gemessene Abbaukurve folgt somit einer idealen heterogenen

Enzymkinetik bei Überschuss des Biokatalysators, und der Polymerabbau erfolgt für das betrachtete System durch einen gleichmäßigen Materialabtrag an der Oberfläche ohne signifikanten Zerfall der Partikel oder Ausbildung von Hohlräumen auf der Oberfläche der Partikel. Aus Abweichungen der Kurvenform in folgenden Experimenten kann somit prinzipiell auf Änderungen des Abbaumechanismus geschlossen werden.

Zur weiteren Quantifizierung der Kinetik des Abbaus von SP 4/6 mit der Lipase aus *Candida cylindracea* wurde der Abbau von SP 4/6 bei verschiedenen Enzymkonzentrationen und Polymeroberflächen untersucht. Eine Vergrößerung der verfügbaren Oberfläche wurde dabei bei konstantem Partikeldurchmesser durch eine Erhöhung der Polyestermasse erreicht. In Abb. 5-11 sind die aus den Anfangssteigungen der Abbaukurven ermittelten Abbauraten in Abhängigkeit von der Proteinmenge aufgetragen.

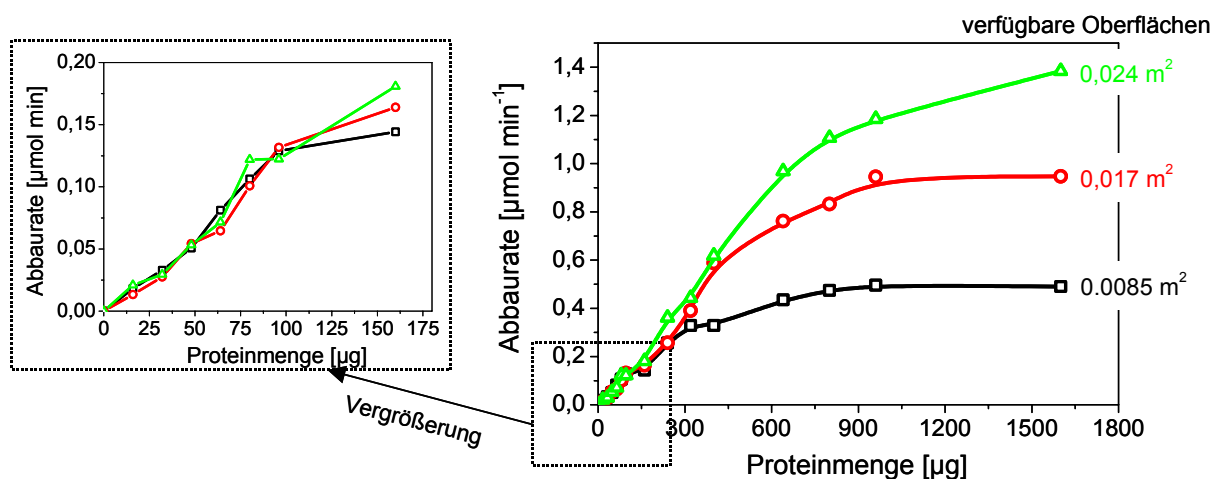


Abb. 5-11: Abhängigkeit der Abbauraten von SP 4/6-Nanopartikeln ( $\varnothing=190 \text{ nm}$ ,  $m=0,35 \text{ mg} \Rightarrow A=0,0085 \text{ m}^2$ ,  $m=0,7 \text{ mg} \Rightarrow A=0,017 \text{ m}^2$ ,  $m=1 \text{ mg} \Rightarrow A=0,024 \text{ m}^2$ ) von der Proteinmenge der Lipase aus *Candida cylindracea* bei  $40^\circ\text{C}$  und  $\text{pH } 7,0$ .

Bei niedrigen Proteinmengen ist die Abbaugeschwindigkeit, wie in der Ausschnittsvergrößerung in Abb. 5-11 deutlich zu erkennen ist, linear proportional zur Proteinmenge. Die Abbaugeschwindigkeit ist in diesem Bereich unabhängig von der angebotenen Kunststoffoberfläche. Die Abbaugeschwindigkeit steigt bei steigender Proteinmenge soweit an, bis ein Maximalwert erreicht wird. Ab diesem Wert bewirkt, analog zu den Untersuchungen von WALTER et al. (1995), eine weitere Vergrößerung der Proteinmenge keine weitere Zunahme der Abbaugeschwindigkeit. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass dann die gesamte angebotene Kunststoffoberfläche mit Enzym belegt ist.

Bei den gewählten Versuchsbedingungen ist es somit möglich, die gesamte verfügbare Oberfläche mit Enzym zu belegen. Wenn neben der Enzymkonzentration die Kunststoffoberfläche vergrößert wird, ist wieder eine Steigerung der Abbaugeschwindigkeit zu erkennen. Die maximale Abbaugeschwindigkeit ist dann der angebotenen Oberfläche proportional.

Mathematisch lassen sich die Beobachtungen wie folgt beschreiben:

Der Belegungsgrad der Oberfläche lässt sich ausdrücken als

$$\theta = \frac{A_{belegt}}{A_{total}} = \frac{q_E}{q_{E\max}}$$

Gleichung 5-15

$\theta$  = Belegungsgrad der Oberfläche

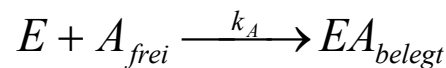
$A_{belegt}$  = mit Enzym belegte Oberfläche [ $\text{cm}^2$ ]

$A_{total}$  = gesamte verfügbare Oberfläche [ $\text{cm}^2$ ]

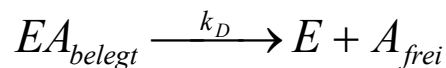
$q_E$  = adsorbierte Enzymmenge [ $\text{mg}_E \text{cm}^{-2}$ ]

$q_{E\max}$  = maximal adsorbierbare Enzymmenge [ $\text{mg}_E \text{cm}^{-2}$ ]

Die Reaktionsgeschwindigkeit ( $r_A$ ) der Adsorption der Enzymmoleküle auf der Oberfläche



und die Reaktionsgeschwindigkeit der Desorption ( $r_D$ )



lassen sich durch

$$r_A = \frac{d[EA_{belegt}]}{dt} = k_A[E](1 - \theta)$$

Gleichung 5-16

$[EA_{belegt}]$  = Konzentration der mit Enzym belegten Oberfläche [ $\text{mmol}_E \text{cm}^{-3}$ ]

$k_A$  = Geschwindigkeitskonstante der Adsorption [ $\text{min}^{-1}$ ]

$[E]$  = Enzymkonzentration [ $\text{mmol}_E \text{cm}^{-3}$ ]

bzw. durch

$$r_D = \frac{d[E]}{dt} = k_D\theta$$

Gleichung 5-17

$k_D$  = Geschwindigkeitskonstante der Desorption [ $\text{mmol cm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ]

beschreiben.

Das Adsorptionsgleichgewicht wird sich dann eingestellt haben, wenn die Geschwindigkeit der Adsorption neuer Enzymmoleküle ( $r_A$ ) gleich der Geschwindigkeit der Desorption bereits adsorbierter Enzymmoleküle ( $r_D$ ) ist [WEDLER 1987].

$$r_A = r_D$$

Gleichung 5-18

$$\Leftrightarrow k_A[E](1-\theta) = k_D\theta$$

Gleichung 5-19

$$\Leftrightarrow \theta = \frac{k_A[E]}{k_D + k_A[E]}$$

Gleichung 5-20

Mit

$$K_A = \frac{k_A}{k_D} = \frac{1}{K_D}$$

Gleichung 5-21

kann Gleichung 5-20 geschrieben werden als

$$\theta = \frac{q_E}{q_{E\max}} = \frac{K_A[E]}{1 + K_A[E]}$$

Gleichung 5-22

Die Abbaugeschwindigkeit der Nanopartikel kann analog zu Gleichung 5-1 anhand von Gleichung 5-23 beschrieben werden.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = kq_E\rho_{EB}A$$

Gleichung 5-23

$n_{EB}$  = Anzahl der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB}$ ]

$t$  = Zeit [min]

$k$  = Geschwindigkeitskonstante [ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1} \text{mg}_E^{-1}$ ]

$q_E$  = adsorbierte Enzymmenge [ $\text{mg}_E^{-1} \text{cm}^{-2}$ ]

$\rho_{EB}$  = Dichte der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB} \text{cm}^{-3}$ ]

$A$  = verfügbare Oberfläche [ $\text{cm}^2$ ]

Für den Sättigungsbereich der Oberfläche mit Enzym (Plateauphase) gilt  $K_A[E] \gg 1$ . Weil

dann der Term  $\frac{K_A[E]}{1 + K_A[E]}$  in Gleichung 5-22 gegen 1 strebt, folgt

$$q_E = q_{E\max}$$

Gleichung 5-24

Daher ist die Abbaugeschwindigkeit für diesen Bereich gegeben durch

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = kq_{E\max}\rho_{EB}A$$

Gleichung 5-25

Da  $k \cdot \rho_{EB}$  konstant ist ( $k'$ ), kann eine weitere Vereinfachung durchgeführt werden.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = k'q_{E\max}A$$

Gleichung 5-26

Die Abbaugeschwindigkeit im Sättigungsbereich ist demnach, wie beobachtet, unabhängig von der Enzymkonzentration aber abhängig von der Oberfläche.

Für den Anfangsbereich der Kurve, d.h. den linearen Anstieg der Abbaurate mit der Enzymmenge (Steigungsbereich) ist  $K_A[E] \ll 1$ . Daraus folgt für die adsorbierte Enzymmenge  $q_E$  aus Gleichung 5-22

$$q_E = K_A[E]q_{E\max}$$

Gleichung 5-27

Aus einer Kombination von Gleichung 5-23 und Gleichung 5-27 ergibt sich für die Abbaugeschwindigkeit

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = kq_{E\max}K_A[E]\rho_{EB}A$$

Gleichung 5-28

Da  $k \cdot \rho_{EB}$  wieder konstant ist ( $k'$ ), kann ebenfalls eine weitere Vereinfachung durchgeführt werden.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = k'q_{E\max}K_A[E]A$$

Gleichung 5-29

Die Abbaugeschwindigkeit in dem Anfangsbereich ist, wie beobachtet, eine Funktion der Enzymkonzentration. Eine Erhöhung der Enzymmenge bewirkt direkt eine Steigerung der Abbaugeschwindigkeit. Zusätzlich ist die Abbaugeschwindigkeit nach Gleichung 5-29 abhängig von der Oberfläche. Da dieses aber nicht aus Abb. 5-11 zu erkennen ist, muss alles Enzym auf der Polyesteroberfläche adsorbiert sein. Aus diesem Grund ist auch kein freies Enzym mehr in Lösung, da gilt

$$[E_{\text{lös}}] = [E_{\text{zudos}}] + [E_{\text{ads}}]$$

$$[E_{\text{lös}}] = \text{Enzymkonzentration in Lösung [mmol}_E \text{ cm}^{-3}]$$

$$[E_{\text{zudos}}] = \text{zudosierte Enzymkonzentration [mmol}_E \text{ cm}^{-3}]$$

$$[E_{\text{ads}}] = \text{adsorbierte Enzymkonzentration [mmol}_E \text{ cm}^{-3}]$$

und folglich hat eine Vergrößerung der Oberfläche keinen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit.

Da aber durch die Ermittlung der Abbauraten nur das Produkt aus  $k'$  und  $q_{E_{\text{max}}}$  bzw. aus  $k'$ ,  $q_{E_{\text{max}}}$  und  $K_A$  ermittelt werden kann, ist eine weitere Auswertung der Ergebnisse auf Basis der vorhandenen Messdaten nicht möglich.

Als Fazit lässt sich feststellen, dass die Versuchsbedingungen in zwei Grenzbereiche unterteilt werden können:

- a) Steigungsphase (Enzymunterschuss): Die verfügbare Oberfläche ist nicht vollständig mit Enzym belegt. Die Abbaugeschwindigkeit ist abhängig von der eingesetzten Proteinmenge des Enzyms. Werden Arbeiten mit Enzymunterschuss durchgeführt, so werden Informationen über den Einfluss des Enzyms auf die Abbaugeschwindigkeit erhalten, wie das Adsorptionsverhalten des Enzyms oder seine Aktivität.
- b) Plateauphase (Enzymüberschuss): Die gesamte verfügbare Oberfläche ist mit Enzym belegt. Die Abbaugeschwindigkeit ist abhängig von der verfügbaren Kunststoffoberfläche, aber unabhängig von der Enzymmenge. Werden Arbeiten mit Enzymüberschuss durchgeführt, so werden Informationen über den Einfluss des Polymers auf die Abbaugeschwindigkeit erhalten, wie die verfügbare Oberfläche oder polymerspezifische Einflussfaktoren (z.B. die Polymerzusammensetzung).

Nachfolgende Abbauuntersuchungen zur Ermittlung des Einflusses der verfügbaren Oberfläche auf die Abbaurate (Kapitel 5.4) wurden dementsprechend im Enzymüberschuss durchgeführt.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Überlegungen lassen sich aus Abb. 5-11 die Proteinmengen der Lipase aus *Candida cylindracea* ermitteln, die zur maximalen Belegung der SP 4/6-Oberfläche notwendig sind (s. Abb. 8-7 im Anhang). Im Folgenden wird nun diese experimentell ermittelte Belegung mit theoretisch berechneten Werten verglichen.



Die Berechnung der benötigten Proteinmenge, um die verfügbare Kunststoffoberfläche vollständig mit Protein zu belegen, wurde unter folgenden Annahmen durchgeführt:

- Die Enzyme belegen eine Fläche, die dem Quadrat ihrer Durchmesser entsprechen
- Die Oberfläche, die dem Protein zur Verfügung steht, berechnet sich aus der Summe der Radien des Nanopartikels und des Proteins

Der Radius des Proteins der Lipase aus *Candida cylindracea* berechnet sich gemäß Gleichung 5-30 nach TONFORD (1961) (gelelektrophoretisch ermitteltes Molekulargewicht  $M = 67000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) mit ca.  $30 \text{ \AA}$  ( $= 3,0 \text{ nm}$ ).

$$R = 0,72 \cdot M^{\frac{1}{3}}$$

Gleichung 5-30

R= Radius eines globulären Proteins [ $\text{\AA}$ ]

M= Molekulargewicht [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

In Tabelle 5-3 sind die aus den oben beschriebenen Annahmen theoretisch berechneten Proteinmengen (s. Gleichung 8-5 bis Gleichung 8-11 im Anhang) und die experimentell ermittelten gegenübergestellt. Um die verschiedenen Oberflächen zu realisieren, wurde bei konstantem Partikeldurchmesser die eingesetzte Kunststoffmasse variiert. Neben dem aliphatischen Homopolyester SP 4/6 wurde noch der aromatische Homopolyester aus 1,4-Butandiol und Isophthalsäure (PBI) als Vergleichspolyester in die Überlegungen mit einbezogen (s. Abb. 8-6 und Abb. 8-7 im Anhang).

Tabelle 5-3: Berechnete und experimentell ermittelte Proteinmenge der Lipase aus *Candida cylindracea* zur vollständigen Belegung der verfügbaren Kunststoffoberfläche

Polyester	Durchmesser [nm]	Oberfläche [m <sup>2</sup> ]	Proteinmenge, die notwendig ist, um die Oberfläche vollständig mit Enzym zu belegen.		$\frac{m_{\text{Protein}}(\text{exp})}{m_{\text{Protein}}(\text{theo})}$
			theoretisch berechnet [μg]	experimentell bestimmt [μg]	
SP 4/6	190	0.0085	20	345	17
		0.017	40	670	17
		0.024	56	960	17
PBI	55	0.029	63	540	8
		0.059	126	1060	8
		0.084	181	1500	8

$m_{\text{Protein}}(\text{exp})$ : experimentell ermittelte Proteinmenge, die notwendig ist, um die gesamte Polymeroberfläche mit Protein zu belegen.

$m_{\text{Protein}}(\text{theo})$ : theoretisch berechnete Proteinmenge, die notwendig ist, um die gesamte Polymeroberfläche mit Protein zu belegen.

Bei allen sechs Versuchen wurden experimentell deutlich größere Proteinmengen zur Absättigung der Oberflächen ermittelt, als theoretisch erwartet. Dabei waren diese Werte immer um den gleichen Faktor größer: 17 bei SP 4/6 und 8 bei PBI. Diese Diskrepanz lässt sich zum einen durch die Reinheit der verwendeten Enzymformulierung erklären (siehe SDS-PAGE Gele, Kapitel 4.1). Neben dem eigentlichen aktiven Lipaseprotein enthält die Formulierung auch noch Fremdproteine, die zur Stabilisierung zugesetzt wurden. Da sich die experimentellen Belegungsdaten auf Bestimmungen des Proteingehaltes (nach LOWRY et al. 1951) stützen, die nicht zwischen den verschiedenen Proteinen unterscheiden, muss der experimentelle Wert größer als der theoretisch berechnete sein.

Zum andern kann diese Diskrepanz dadurch erklärt werden, dass es sich bei den experimentell ermittelten Proteinmengen um die zudosierte Proteinmenge und nicht um die tatsächlich adsorbierte handelt. So entsprechen die experimentell ermittelten Proteinmengen der Summe aus adsorbiertem Protein und dem freien Protein in Lösung, was die hohen Quotienten von 17 bei SP 4/6 bzw. 8 bei PBI in Tabelle 5-3 erklärt. Eine Unterscheidung zwischen adsorbiertem Protein und Protein in Lösung ist aufgrund der vorhandenen Messdaten nicht möglich.

Offen bleibt allerdings die Frage, warum von der Lipase aus *Candida cylindracea* unterschiedliche Proteinmengen benötigt werden, um eine ähnlich große Oberflächen verschiedener Polyester (SP 4/6 und PBI) vollständig zu belegen.

Als Erklärung hierfür kann das Adsorptionsverhalten der Lipase herangezogen werden, denn laut JÄGER et al. (1994) ist die Adsorption des Enzyms auf der Oberfläche der erste Schritt der enzymatischen Hydrolyse. Es kann vermutet werden, dass die Lipase aus *Candida cylindracea* besser auf einer SP 4/6-Oberfläche adsorbiert als auf einer PBI-Oberfläche, da SP 4/6 schneller enzymatisch gespalten wird. Diese Vermutung spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider: eine 0,024 m<sup>2</sup> große SP 4/6-Oberfläche wird mit 960 µg Protein belegt, während auf einer 0,029 m<sup>2</sup> großen PBI-Oberfläche nur 540 µg Protein adsorbieren. Unterschiede im Adsorptionsverhalten von Enzymen sind in der Literatur bereits beschrieben: So formulierte WALTER (1996) einen direkten Zusammenhang zwischen der Hydrolysegeschwindigkeit linearer aliphatischer Homopolyester und dem Adsorptionsverhalten der verwendeten Lipase aus *Rhizopus delemar*. Eine Abhängigkeit der Adsorption der Lipase aus *Rhizopus delemar* von der Hydrophobizität der Polyesteroberfläche wurde von KLEIN (1996) postuliert.

Eine Abhängigkeit des Abbaus von der Adsorptionsneigung der PHB-Depolymerasen wurde ebenfalls bereits beschrieben. PHB-Depolymerasen spalten nur dann Esterbindungen der Polyhydroxybuttersäuren (PHB), wenn sie auf dem Polymer adsorbieren können. Da PHB-Depolymerasen aufgrund der hohen Flexibilität der Polymerketten nicht auf rein amorphem ataktischem PHB adsorbieren können, wird dieses Polymer auch nicht von PHB-Depolymerasen gespalten [ABE et al. 1995]. Durch Blenden dieses amorphen PHB mit kristallinen Polyestern wie z.B. mit bakteriellem kristallinem PHB [SCANDOLA et al. 1997 a)], mit Poly(pivalactone) [SCANDOLA et al. 1997 b)], mit Poly(ε-caprolacton) (PCL) oder Polymilchsäure (PLA) [FOCARETE et al. 1998] wird eine Adsorption der Depolymerase und damit der enzymatische Abbau ermöglicht. Dieses Phänomen wird als „kristall-induzierter“ Abbau beschrieben [ABE et al. 1995]. Neben kristallinen Polyestern kann dieser „kristall-induzierte“ Abbau auch durch starre amorphe Polyester, wie z.B. Poly(methylmethacrylat) (PMMA) [HE et al. 2001 a), HE et al. 2001 b), HE et al. 2000] induziert werden, dessen Ketten aufgrund der hohen Glasstemperatur starr genug sind, sodass die PHB-Depolymerase adsorbieren kann.

Die unterschiedlichen Proteinmengen, die zur vollständigen Belegung der verschiedenen Polyesteroberflächen benötigt werden, können folglich auf unterschiedliche Adsorptionsverhalten der Lipase auf verschiedenen Polyestern zurückgeführt werden.

## 5.4 Korrelation der Abbaurrate mit der Polyesteroberfläche

Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben, kann die Abbaugeschwindigkeit von Polyestern durch den Einsatz von Polyester-Nanopartikeln im Vergleich mit Polyester-Filmen drastisch gesteigert werden. Es stellt sich nun die Frage, ob die Beschleunigung der Abbaurrate proportional zur Vergrößerung der verfügbaren Kunststoffoberfläche ist. Dazu wird in diesem Kapitel quantitativ der Einfluss der verfügbaren Oberfläche auf die Abbaugeschwindigkeit beschrieben. Alle folgenden Messungen wurden im Enzymüberschuss durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Abbaugeschwindigkeit unabhängig von der Enzymkonzentration nur eine Funktion der verfügbaren Oberfläche ist.

Anders als in Kapitel 5.3, in dem die Kunststoffoberfläche bei gleichbleibendem Partikeldurchmesser durch eine Änderung der Kunststoffmasse variiert wurde, wird jetzt eine Veränderung der verfügbaren Oberfläche durch eine Variation der Partikeldurchmesser erreicht. Für eine möglichst weite Variation der verfügbaren Polymeroberfläche wurden Filme, Kugeln, Mikro- und Nanopartikel unterschiedlicher Durchmesser in einem enzymatischen Labortest mit der Lipase aus *Candida cylindracea* abgebaut. Die in Abb. 5-12 dargestellten Abbauraten wurden aus den Anfangssteigungen der Abbaukurven ermittelt.

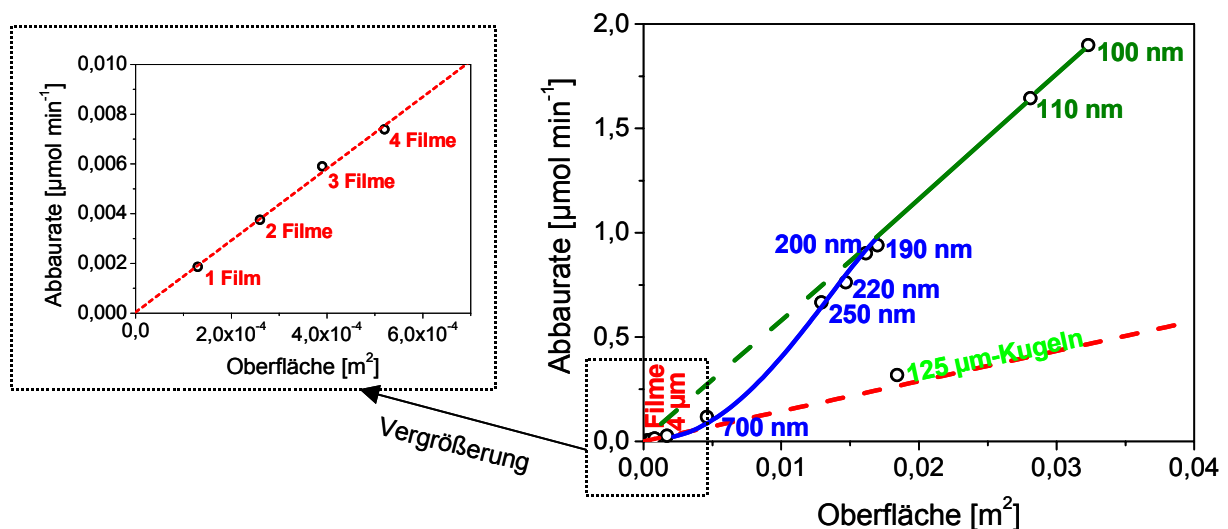


Abb. 5-12: Zusammenhang zwischen der Abbaurrate und der verfügbaren Kunststoffoberfläche (Polyester: SP 4/6; Lipase: Lipase aus *Candida cylindracea*; 40°C; pH 7.0).

Während bei Filmen eine linear proportionale Zunahme der Abbaugeschwindigkeit mit der verfügbaren Oberfläche nachgewiesen werden konnte, war bei Übergang zu Nanopartikeln

eine überproportionale Steigerung der Abbaurate in Bezug auf die verfügbare Polymeroberfläche zu beobachten. Bei Nanopartikeln mit einem Durchmesser von z.B. 100 nm war die Abbaurate im Vergleich zu Filmen viermal höher als durch die Vergrößerung der Oberfläche zu erwarten gewesen wäre. Dies deutet darauf hin, dass neben der verfügbaren Oberfläche noch andere Faktoren die Abbaugeschwindigkeit signifikant beeinflussen.

Eine Herstellung von Partikeln mit einem Durchmesser größer als 250 nm war aufgrund der bereits in Kapitel 4.6.1 beschriebenen Agglomeration größerer Partikel nicht möglich.

Ein Faktor, der die Abbaugeschwindigkeit beeinflusst, könnte im Fall der Nanopartikel das Größenverhältnis zwischen Enzym und Kunststoffpartikel darstellen. Durch die starke Krümmung der Oberfläche der Polyester-Nanopartikel könnte die Adsorption des Enzyms auf der Kunststoffoberfläche behindert werden. Der Durchmesser der Lipase aus *Candida cylindracea* berechnet sich gemäß Gleichung 5-30 (s. Kapitel 5.3) nach TONFORD (1961) mit ca. 60 Å (= 6,0 nm). Damit ist das Enzym ca. 17 mal kleiner als ein Nanopartikel mit einem Durchmesser von 100 nm. Aufgrund dieser Größenbetrachtung wird eine Beeinflussung der Enzymadsorption aufgrund der Partikelkrümmung als unwahrscheinlich angesehen.

Da im Gegensatz zu den Nanopartikeln die höhere Abbaurate der Kugeln mit der Vergrößerung der Oberfläche korreliert, kann geschlossen werden, dass ein Parameter, der zur Erklärung der überproportionalen Abbaugeschwindigkeit der Nanopartikel herangezogen werden könnte eine veränderte Materialstruktur in Nanopartikeln im Vergleich zu Kugeln oder Filmen ist. Aus der Literatur ist z.B. bekannt, dass die Kristallinität von Polyestern einen signifikanten Einfluss auf deren Abbaugeschwindigkeit hat [MOCHIZUKI und HIRAMI 1996]. Denn amorphe, ungeordnete Polymerbereiche werden enzymatisch schneller abgebaut als kristalline Domänen [YOO und IM 1999, IWATA und DOI 1999] und für verschiedene Polymere ist bekannt, dass sich deren Kristallisationsverhalten in Proben kleiner Dimensionen von dem in grobkörnigeren Pendants unterscheidet [FRANK et al. 1996].

Die nachfolgenden Untersuchungen zielen nun auf die Frage, ob die beobachteten Effekte beim enzymatischen Abbau von Polyester-Nanopartikeln auf Änderungen in der Materialstruktur zurückgeführt werden können.

## 5.5 Abbau von Nanopartikeln verschiedener Polyester

Erste Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Polyester-Nanopartikeln ergaben, dass der Abbau beschleunigt werden kann. Zusätzlich gibt es erste Hinweise, dass sich wahrscheinlich die Kristallinität der Polyester in den Nanopartikeln von der in größer dimensionierten Partikeln unterscheidet. In den folgenden Unterkapiteln soll deshalb untersucht werden, inwieweit sich diese Beschleunigung auch auf andere Polyester übertragen lässt und ob bzw. wie sich die kristalline Struktur in den Nanopartikeln von denen in größer dimensionierten Partikeln unterscheidet.

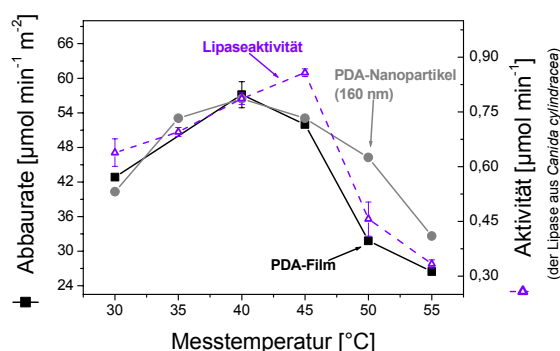
### 5.5.1 Aliphatische Homopolyester

Da sich aus den Ergebnissen, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden, die Vermutung ergab, dass die übergeordnete Polymerstruktur, d.h. die Kristallinität in den Nanopartikeln von der in den teilkristallinen Filmen unterscheidet, sollte in einem nächsten Schritt Informationen über die Kristallinität der Nanopartikel gewonnen werden. Aufgrund der geringen Polymerkonzentration von maximal  $6 \text{ mg ml}^{-1}$ , bei der stabile Nanopartikel-Suspensionen ohne Zusatz von Detergentien darzustellen waren, war eine direkte Bestimmung der Kristallinität der Nanopartikel - weder mittels DSC-Messungen noch mittels Röntgenstreumessungen - nicht möglich. Folglich musste in dieser Arbeit auf indirekte Informationen zur Charakterisierung der Kristallinität zurückgegriffen werden.

Laut MARTEN (2000) zeigen teilkristalline, lineare aliphatische Homopolyester (z.B. SP 4/6) eine starke Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von der Differenz zwischen der Polyesterschmelztemperatur und der Abbautemperatur. Mit zunehmender Temperaturdifferenz sinken die enzymatischen Abbauraten der Polyester. Begründet wird diese Beobachtung damit, dass für die Abbaugeschwindigkeit dieser Polyester hauptsächlich das thermische Verhalten der kristallinen Bereiche entscheidend ist. Durch eine Steigerung der Umgebungstemperatur wird die Mobilität der Polyesterketten innerhalb der Kristallite erhöht und damit die Möglichkeit zum aktiven Zentrum der Lipasen vorzudringen, vergrößert. Bei rein amorphen Polyestern liegen hingegen alle Polymerketten bereits mit einer ausreichenden Mobilität vor, um in das aktive Zentrum der Lipase zu gelangen, sodass eine weitere Temperaturerhöhung keine weitere Steigerung der Abbaurate bewirken dürfte. Aus diesem Grund sollte außer der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität (enzymatische Katalyse an niedermolekularen Ölen) keine Temperaturabhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit bei rein amorphen Polyestern festzustellen sein.

Um zu überprüfen, ob diese Schlussfolgerung zulässig ist, wurden zunächst sowohl Filme als auch Nanopartikel eines vollständig amorphen aliphatischen Homopolyesters aus Diethylenglykol und Adipinsäure (PDA) bei unterschiedlichen Temperaturen mit der Lipase aus *Candida cylindracea* bezüglich der Abbaugeschwindigkeit charakterisiert (s. Abb. 5-13 a). Um den Einfluss der Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Katalyse auf die Temperaturabhängigkeit der Abbauraten der Polyester zu berücksichtigen, wurde eine Korrektur der Polyester-Abbauraten durchgeführt. Dazu wurde die bei 45°C (Temperaturoptimum der Lipase aus *Candida cylindracea*) gegenüber den Triglyceriden gemessene Enzymaktivität gleich 1 gesetzt. Zur Nivellierung des Temperatureinflusses der Enzymaktivität wurden die Abbauraten der Nanopartikel, bzw. der Filme durch die normierten Enzymaktivitäten dividiert (s. Kapitel 4.9). Die so berechneten Abbauraten sind in Abb. 5-13 b) dargestellt.

a)



b)

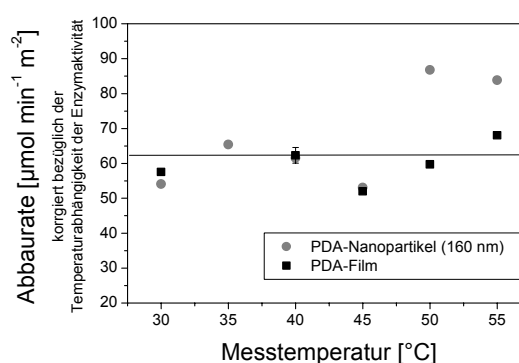


Abb. 5-13: Abhängigkeit der Abbauraten von PDA-Filmen ( $\varnothing=1,8$  cm, nur eine Seite des Filmes verfügbar, da der Film auf dem Boden des Reaktionsgefäßes anhaftet, s. Kapitel 4.4.2,  $A=2,54$  cm<sup>2</sup>) und PDA-Nanopartikeln ( $\varnothing=160$  nm,  $m=0,7$  mg,  $A=202$  cm<sup>2</sup>) von der Messtemperatur. Zum Vergleich die temperaturabhängige Aktivität der Lipase aus *Candida cylindracea* gegenüber Triolein und Triacetin. a) gemessene Abbauraten b) bezüglich der Enzymaktivität korrigierte Abbauraten (s. Kapitel 4.9).

Die Ergebnisse bestätigen zum einen die verwendete Messmethode, da die Abbauraten der PDA-Nanopartikel und des PDA-Filmes - bezogen auf die Oberfläche - sehr gut übereinstimmen. Der Polyester zeigt in beiden Fällen eine Abbauraten von  $56 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ .

Zum anderen wird durch diese Messungen die oben beschriebene Schlussfolgerung bestätigt, dass außer der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität keine Temperaturabhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit bei rein amorphen Polyestern festgestellt werden kann. Die ermittelten Aktivierungsenergien nach Arrhenius der Spaltung der

Esterbindungen des Polyesters im Film ( $E_A=22 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und in den Nanopartikeln ( $E_A=25 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) entsprechen in etwa der Aktivierungsenergie der Esterspaltung der flüssigen Triglyceride, Triolein und Triacetin ( $E_A=16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) mittels der Lipase aus *Candida cylindracea* (zur Bestimmung der Aktivierungsenergie s. Abb. 8-10 im Anhang). Der amorphe Polyester weist folglich sowohl als Film als auch als Nanopartikel deutlich geringere Temperaturabhängigkeit auf, wie sie für teilkristalline Polyester beobachtet wurde [MARTEN 2000].

Wider Erwarten ist aber ein Anstieg dieser auf die Enzymaktivität korrigierten Abbauraten bei 50°C und 55°C zu beobachten, was sich jedoch mit einer Denaturierung des Enzyms aufgrund der hohen Messtemperatur erklären lässt.

Da, die Temperaturabhängigkeit der Abbaurate von amorphen Polyestern im Gegensatz zu der von teilkristallinen Polyestern nur durch die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Katalyse bedingt ist, sollte es demnach möglich sein über die Temperaturabhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von Polyestern Aussagen über deren Kristallinität bzw. Amorphizität zu treffen.

Basierend auf diesem Ansatz wurde die Temperaturabhängigkeit aliphatischer Polyester dazu genutzt, um Aussagen über die Kristallinität der Polyester in den Nanopartikeln zu erhalten. Zunächst wurde ein Polyester aus 1,3-Propandiol und Adipinsäure (SP 3/6) als Modellsubstanz (Filme und Nanopartikel) eingesetzt, da dieser Polyester einen Schmelzpunkt von 42°C besitzt. Dieser Schmelzpunkt liegt in dem Temperaturbereich, in dem die Lipase aus *Candida cylindracea* aktiv ist, sodass Abbauuntersuchungen oberhalb und unterhalb des Schmelzpunktes durchgeführt werden können. Um eine mit dem Schmelzen des Filmes verbundene Verklumpung des Filmes oder Verklebung mit dem Magnetrührer und damit eine Änderung der verfügbaren Oberfläche zu verhindern, wurden die Filme in Filterpapier eingepresst. Wie erwartet nehmen bei den Filmen mit steigender Messtemperatur sowohl die gemessenen Abbauraten (s. Abb. 8-9 a) im Anhang) als auch die auf die Enzymaktivität korrigierten Abbauraten (s. Abb. 8-9 b) im Anhang) zu. Die Aktivierungsenergie der Spaltung der Esterbindungen in dem Polyester-Film ist mit  $103 \text{ kJ mol}^{-1}$  um den Faktor 7 größer als die Aktivierungsenergie der Triglyceridspaltung mittels der Lipase aus *Candida cylindracea* ( $E_A=16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Hier wird die steigende Abbaugeschwindigkeit durch die bei wachsender Temperatur verringerte Anziehungskraft zwischen den Polymerketten und die damit verbundene Zunahme der Kettenmobilität bewirkt [MARTEN 2000]. SP 3/6 zeigt somit die typische Temperaturabhängigkeit der Esterspaltung eines teilkristallinen Polyesters. Bei Temperaturen oberhalb des Polyesterschmelzpunktes ist dagegen keine weitere Steigerung der Abbaurate mit zunehmender Messtemperatur



festzustellen. Bei diesen Temperaturen sind die wirksamen Anziehungskräfte zwischen den Polymerketten in den Kristalliten überwunden, sodass eine weitere Temperaturerhöhung keine weitere Zunahme der Kettenmobilität und damit keine weitere Erhöhung der Abbaurate bewirkt. Der Polyester verhält sich wie ein rein amorphes Polymer.

Im Gegensatz zu den Abbauraten der Filme, ist bei denen der SP 3/6-Nanopartikeln analog zu den bekanntermaßen amorphen Nanopartikeln des PDA keine Abhängigkeit der Abbaurate von der Messtemperatur festzustellen (s. Abb. 8-9 b) im Anhang). Die Aktivierungsenergie für die Spaltung der Esterbindungen der SP 3/6-Nanopartikeln ( $E_A=16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) entspricht wiederum der Aktivierungsenergie der Spaltung der Esterbindungen der flüssigen Triglyceride, Triolein und Triacetin, ( $E_A=16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die Nanopartikel des SP 3/6 amorph sind.

Analoge Temperaturabhängigkeiten der Abbaugeschwindigkeiten wurden auch für Nanopartikel anderer aliphatischer Homopolyester, wie z.B. bei SP 4/4 ( $E_A=16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und SP 4/6 ( $E_A=14 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) ermittelt, so dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass diese aliphatischen Polyester in Nanopartikeln in rein amorpher Form vorliegen. Die entsprechenden temperaturabhängigen Abbauraten sind im Anhang in Abb. 8-11 dargestellt.

Weiter gestützt wird die Überlegung, dass Nanopartikel aliphatischer Homopolyester amorph sind dadurch, dass sowohl die Esterbindungen in einem SP 3/6-Film (Herstellung des Filmes wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben) bei der Schmelztemperatur (keine Kristallite;  $AR_{enz}=85 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ), als auch die Esterbindungen in SP 3/6-Nanopartikeln ( $AR_{enz}=74 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) mit einer ähnlichen Abbaurate ( $AR_{enz}$ ) gespalten werden.

Folglich deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass die Nanopartikel der aliphatischen Homopolyester amorph sind. Da amorphe Bereiche schneller abgebaut werden als kristalline Domänen, ist dies eine Erklärung für die überproportionale Steigerung der Abbaugeschwindigkeit der Nanopartikel im Vergleich zu den Filmen dar (s. Kapitel 5.4).

Die überproportionale Steigerung der Abbaurate der Nanopartikel im Vergleich zu den Filmen wurde auch bei anderen hier untersuchten aliphatischen Homopolyestern beobachtet. Eine Zusammenstellung findet sich in Tabelle 5-4.

Tabelle 5-4: Vergleich der Abbauraten von Nanopartikeln mit den Abbauraten von Filmen (zwei Filme,  $\varnothing=0,9$  cm,  $A=2,54$  cm<sup>2</sup>) verschiedener aliphatischer Polyester bei 40°C (Lipase aus *Candida cylindracea*)

Polymer	$T_m$ <sup>a)</sup> [°C]	$\Delta H$ <sup>a)</sup> [J g <sup>-1</sup> ]	$X_c$ <sup>b)</sup> [%]	$T_m - T_{\text{Mess}}$ [°C]	Partikel- grösse [nm]	$AR_{\text{enz}}(N)$ <sup>c)</sup> [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ]	$\frac{AR_{\text{enz}}(N)}{AR_{\text{enz}}(F)}$ <sup>d)</sup>
SP 3/4 <sup>e)</sup>	47	48	51	12	182	95	0.4
SP 3/6 <sup>e)</sup>	42	53	43	7	244	74	1
SP 5/6 <sup>e)</sup>	42	60	41	7	129	48	1
BASu 50:50	56	40	32	16	202	56	1
SP 5/7 <sup>e)</sup>	42	70	46	7	247	80	1.3
SP 6/4	51	77	57	11	244	46	2
SP 3/10	55	67	42	15	240	271	2
BASu 90:10	55	60	41	15	197	50	2
BASu 70:30 <sup>f)</sup>	42	55	43	12	194	80	2
SP 4/6	56	66	49	16	195	56	4
SP 6/6	58	89	58	18	267	43	4.5
SP 3/9	56	64	40	16	245	554	5
BASu 30:70	85	43	36	45	206	67	8
SP 3/12	65	93	58	25	251	444	28
SP 4/8	60	80	52	20	210	165	37
SP 4/4	114	72	65	74	200	77	>77 <sup>g)</sup>
BASu 10:90	106	62	55	64	200	90	>90 <sup>g)</sup>
SP 4/10	66	89	53	26	170	181	>180 <sup>g)</sup>
SP 4/12	73	90	50	33	289	300	>300 <sup>g)</sup>
SP 3/13	73	81	45	33	216	370	>370 <sup>g)</sup>

<sup>a)</sup> folgendes Messprogramm bei der DSC wurde verwendet: -10°C bis 150°C, 10°C/min

<sup>b)</sup>  $X_c$ : prozentualer Massenanteil der Filme an kristallinem Polymer, berechnet nach Gleichung 5-31.

<sup>c)</sup> auf die Oberfläche bezogene Abbaurate der Nanopartikel [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ]

<sup>d)</sup> Verhältnis der auf die Oberfläche bezogenen Abbaurate der Nanopartikel ( $AR_{\text{enz}}(N)$  in [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ]) zu der auf die Oberfläche bezogenen Abbaurate der Filme ( $AR_{\text{enz}}(F)$  in [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ])

<sup>e)</sup> Abbaurate der Filme bei 35°C gemessen

<sup>f)</sup> Abbaurate der Filme bei 30°C gemessen

<sup>g)</sup> abgeschätzte Werte, da bei den Filmen keine Abbaurate festzustellen war. Hier wurde für den Abbau der Filme ein fiktiver Wert von  $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$  eingesetzt, da dieser Wert der minimalen Messrate entspricht, die mit dem Titrationssystem noch sicher erfasst werden kann.

Die Polyester lassen sich aufgrund des Verhältnisses der Abbauraten der Nanopartikel zu der Abbauraten der Filme  $\left( \frac{AR_{enz}(N)}{AR_{enz}(F)} \right)$  in drei Gruppen unterteilen:

$$1) \frac{AR_{enz}(N)}{AR_{enz}(F)} \cong 1$$

In dieser Gruppe entspricht die Abbauraten der Nanopartikel der Abbauraten der Filme. Diese Übereinstimmung der Abbauraten weist darauf hin, dass sowohl in den Nanopartikeln als auch in den Filmen ähnliche Kristallinitäten vorliegen: eventuell sind die Nanopartikel dieser Polyester kristallin, was aber bereits ausgeschlossen wurde, da die Nanopartikel des SP 3/6 amorph sind. Da aber der Abbau sehr nahe am Schmelzpunkt stattfindet (die Differenz zwischen Schmelz- und Messtemperatur ist für die Polyester dieser Gruppe nicht größer als 7°C), ist die Mobilität der Polymerketten in den kristallinen Bereichen der Filme bereits sehr hoch, sodass sie sich nicht mehr wesentlich von denen der amorphen Phase unterscheidet und dadurch auch nur sehr geringe Unterschiede in den Abbaugeschwindigkeiten auftreten, was den Quotienten der Abbauraten nahe eins bedingt.

Dieser Überlegung stehen scheinbar die großen Temperaturdifferenzen bei SP 3/4 ( $T_m - T_{Mess} = 12^\circ\text{C}$ ) und BASu 50:50 ( $T_m - T_{Mess} = 16^\circ\text{C}$ ) gegenüber. Diese beiden Polyester zeigen aber im Gegensatz zu den anderen Polyestern dieser Gruppe eine sehr geringe Kristallisationsgeschwindigkeit. So kann bei SP 3/4 nach einer Lagerung bei  $-10^\circ\text{C}$  für 15 Minuten keine Kristallitbildung mittels DSC nachgewiesen werden, und bei BASu 50:50 ist lediglich ein schwacher Schmelzpeak ( $\Delta H_m(\text{BASu 50:50}) = 40 \text{ J g}^{-1}$  im Vergleich zu  $\Delta H_m(\text{SP 4/4}) = 72 \text{ J g}^{-1}$ ) zu beobachten. Mittels der nach VAN KREVELEN (1990) berechneten Schmelzenthalpie eines vollständig kristallinen Polyesters (zur Berechnung dieser Schmelzenthalpie s. Tabelle 8-2 im Anhang) lassen sich nach Gleichung 5-31 über die mittels DSC gemessenen Schmelzenthalpie die Kristallinitäten der Filme berechnen [KONG und HAY 2002].

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0}$$

Gleichung 5-31

$X_c$  = Massenanteil an kristallinem Polymer

$\Delta H_m$  = Gemessene Schmelzenthalpie aus DSC-Messungen [ $\text{J g}^{-1}$ ]

$\Delta H_m^0$  = Schmelzenthalpie des vollständig kristallinen Polymers [ $\text{J g}^{-1}$ ]

So ergibt sich für SP 3/4 eine Kristallinität von nur 51% und für BASu 50:50 eine von 32%. Im Vergleich dazu liegen die Kristallinitäten der Polyester mit einer vergleichbaren Differenz zwischen Mess- und Schmelztemperatur bei 57% (SP 6/4) und 58% (SP 6/6).

Aufgrund dieser geringen Kristallinitäten ist der amorphe Anteil groß, und damit die Mobilität der Ketten und folglich die Abbaugeschwindigkeit der Filme trotz der großen Differenz zwischen und Schmelz- und Messtemperatur relativ hoch.

$$2) \frac{AR_{enz}(N)}{AR_{enz}(F)} > 1$$

In dieser Gruppe ist die Differenz zwischen Mess- und Schmelztemperatur mit 11°C bis 18°C größer als in der ersten Gruppe. Infolgedessen ist die Mobilität der Ketten in den Filmen eingeschränkt, und damit die Abbaugeschwindigkeit geringer als in den amorphen Nanopartikeln, was sich in dem Verhältnis der Abbauraten entsprechend widerspiegelt.

$$3) \frac{AR_{enz}(N)}{AR_{enz}(F)} \gg 1$$

In dieser Gruppe ist neben dem Verhältnis der Abbaurate der Nanopartikel zu der Abbaurate der Filme auch die Differenz zwischen Mess- und Schmelztemperatur am größten. Die Abbaurate der Filme ist demnach sehr viel geringer als die der amorphen Nanopartikel. Bei einigen Polyestern konnte aufgrund der geringen Abbaurate bei den Filmen mit den verwendeten experimentellen Methoden sogar keine Esterspaltung nachgewiesen werden.

Als Fazit lässt sich feststellen, dass die Nanopartikel aller untersuchten aliphatischen Polyester amorph sind, was die von der Oberfläche her überproportionale Steigerung der Abbaurate der Nanopartikel im Vergleich zu den Filmen erklärt. Außerdem kann durch die Messungen an den Polyester-Nanopartikeln gezeigt werden, dass auch Esterbindungen in Polyestern von Lipasen gespalten werden können, bei denen im Film keine Esterspaltung nachzuweisen war. Der enzymatische Abbau von Polyestern wird demnach offensichtlich in erster Linie von der Kristallinität und damit von der Mobilität der Polyesterketten bestimmt und nicht primär von Aspekten der Substratspezifität der Lipasen bezüglich der chemischen Kettenstruktur der verschiedenen aliphatischen Polyester.

### 5.5.2 Aromatische Homopolyester

Aus den Untersuchungen in Kapitel 5.5.1 wird deutlich, dass durch die Verwendung von Polyester-Nanopartikeln eine enzymatische Esterspaltung bei Polyestern nachgewiesen werden kann, bei denen z.B. bei Filmen keine enzymatische Esterspaltung zu messen ist. Nun stellt sich die Frage, ob durch die Verwendung von Nanopartikeln auch eine enzymatische Spaltung von aromatischen Polyestern, die als biologisch nicht abbaubar gelten [MÜLLER et al. 2001], erfasst werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurden Nanopartikel verschiedener aromatischer Homopolyester mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C eingesetzt. Abb. 5-14 zeigt die Abbaukurven.

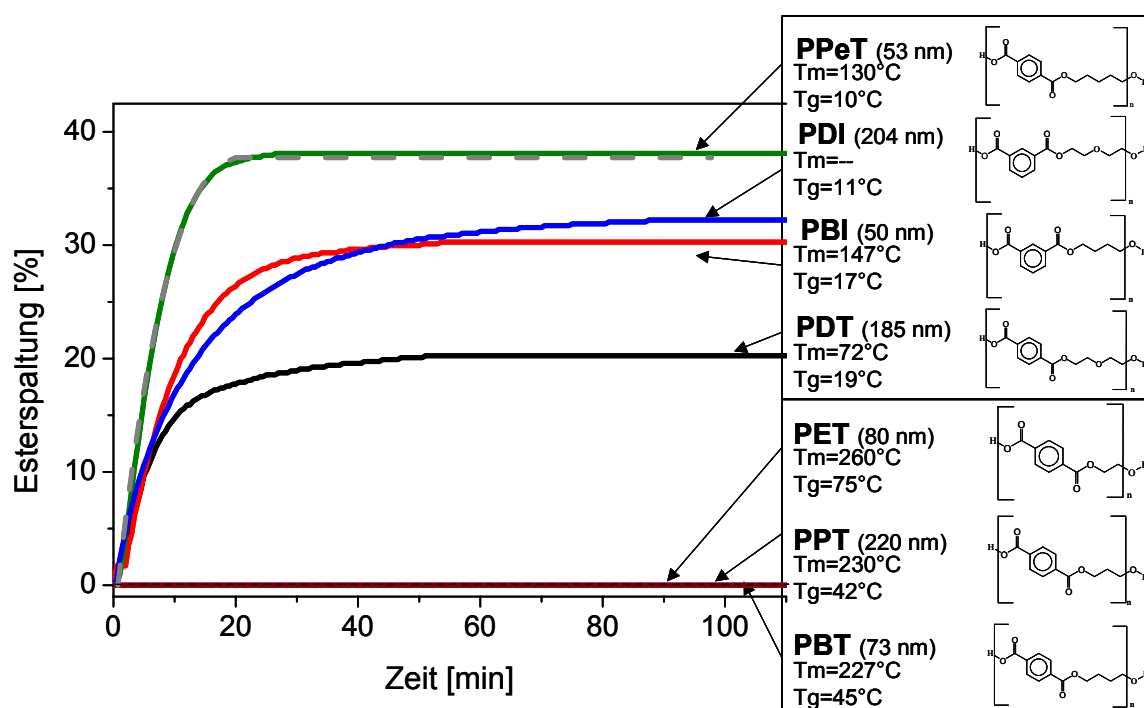


Abb. 5-14: Abbau von Nanopartikeln aromatischer Homopolyester mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C. Die gestrichelte graue Linie entspricht dem theoretischen Abbauverlauf, wie er sich aus der berechneten Abnahme der Partikeloberfläche während des Abbaus ergibt (s. Kapitel 5.3). Der Polyester PDI ist vollständig amorph, weshalb kein Schmelzpunkt angegeben werden kann.

Durch die in Abb. 5-14 gezeigten Ergebnisse kann somit erstmals nachgewiesen werden, dass prinzipiell auch Esterbindungen von einigen rein aromatischen Homopolyestern von Lipasen gespalten werden. Während für Filme der gleichen aromatischen Homopolyester aufgrund deren hoher Schmelzpunkte keinerlei enzymatischer Abbau messbar ist, kann mit Hilfe der Nanopartikel ein deutlicher Abbau im Verlauf von wenigen Stunden nachgewiesen werden. Die Divergenzen in den Plateaus der maximal erreichten Esterspaltungen erklären sich durch Unterschiede in den Löslichkeiten der Oligomere der aromatischen Polyester (s. Kapitel 5.1).

Aufgrund der guten Übereinstimmung der theoretisch aus der verfügbaren Oberfläche berechneten mit der experimentell ermittelten Abbaukurve, kann davon ausgegangen werden, dass, analog zum Abbau der Nanopartikel aliphatischer Homopolyester, die Nanopartikel der aromatischen Homopolyester ebenfalls gleichmäßig von der Oberfläche her abgetragen werden.

Es stellt sich nun die Frage, warum bei Nanopartikeln aromatischer Homopolyester im Gegensatz zu den Filmen eine Esterspaltung beobachtet werden kann.

Einen Grund hierfür könnte einfach die Vergrößerung des Messeffektes bedingt durch eine Vergrößerung der Oberfläche darstellen. Dagegen spricht jedoch, dass z.B. eine Abbaurate eines aromatischen Homopolyesters aus 1,4-Butandiol und Isophthalsäure (PBI), die aus Messungen bei 50°C an Nanopartikeln ( $\varnothing=50$  nm) mit  $4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$  (Lipase aus *Pseudomonas species*) bestimmt wurde, auch bei Filmen hätte gemessen werden müssen (die minimale Abbaurate, die mit dem Titrationssystem noch sicher erfasst werden kann, entspricht  $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Es müssen demnach, wie bei den aliphatischen Homopolyestern, neben der verfügbaren Oberfläche noch andere Faktoren die Abbaugeschwindigkeit der aromatischen Polyester beeinflussen. Es könnte sich, wie bei den aliphatischen Polyestern beobachtet, wieder um eine Änderungen der übergeordneten Polymerstruktur (Kristallinität) handeln. Um zu überprüfen, ob die Nanopartikel der aromatischen Homopolyester eine andere Kristallinität aufweisen als die Filme, wird wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben, die Abbaurate, die aus der Steigung der Abbaukurve ermittelt wurde, in Abhängigkeit von der Messtemperatur bestimmt (s. Abb. 8-13 im Anhang). In Tabelle 5-5 sind die Aktivierungsenergien der verschiedenen enzymatischen Esterspaltungen zusammengefasst.

Tabelle 5-5: Vergleich der Aktivierungsenergien der Esterspaltung verschiedener aromatischer Homopolyester mit der Lipase aus *Pseudomonas species*.

Substanz	Aktivierungsenergie
Adipinsäuredibutylester	$25 \text{ kJ mol}^{-1}$
PDT	$91 \text{ kJ mol}^{-1}$
PBI	$70 \text{ kJ mol}^{-1}$
PDI	$50 \text{ kJ mol}^{-1}$
PPeT	$108 \text{ kJ mol}^{-1}$

Die Aktivierungsenergien der enzymatischen Spaltung der Esterbindungen der aromatischen Homopolyester mit der Lipase aus *Pseudomonas species* ist mit  $50\text{-}110 \text{ kJ mol}^{-1}$  in allen Fällen größer als die der enzymatischen Spaltung der Esterbindungen des Öls

Adipinsäuredibutylester ( $E_A=25 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) mit der gleichen Lipase. Diese Beobachtung ließe sich dadurch erklären, dass die Nanopartikel der aromatischen Homopolyester im Gegensatz zu den Nanopartikeln der aliphatischen Homopolyester teilkristallin sind. Dieser Überlegung steht aber entgegen, dass die berechnete Aktivierungsenergie der Esterspaltung des aromatischen Homopolyester aus Diethylenglykol und Terephthalsäure (PDT), der, wie später gezeigt wird, sogar als Film amorph ist, mit  $91 \text{ kJ mol}^{-1}$  3,6fach so groß ist wie die Aktivierungsenergie der enzymatischen Katalyse ( $25 \text{ kJ mol}^{-1}$  von Adipinsäuredibutylester mittels der Lipase aus *Pseudomonas species*). Die Temperaturabhängigkeit der Abbaurate der Polyester-Nanopartikel kann deshalb nicht, wie bei teilkristallinen Filmen, mit der Kristallinität erklärt werden.

Für die aromatischen Polyester könnte nun eine andere Einflussgröße, nämlich die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) eine Rolle spielen. Wie aus Abb. 5-14 hervorgeht, werden nur solche aromatischen Polyester-Nanopartikel enzymatisch abgebaut, deren  $T_g$  unterhalb der Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}}$ ) liegt. Für die Abhängigkeit der Abbauraten würde dann analog zur Differenz ( $T_m - T_{\text{Mess}}$ ), wie sie zur Beschreibung des Abbauverhaltens von Polyesterfilmen verwendet wurde [MARTEN 2000], durch eine Größe ( $T_{\text{Mess}} - T_g$ ) zu korrelieren sein. Dieser Effekt könnte auch die beobachtete Temperaturabhängigkeit des Abbaus bei den aromatischen Polyester-Nanopartikeln erklären, auch wenn diese nicht-kristallin vorliegen. Diese Abhängigkeit wird noch näher in Kapitel 5.7 beschrieben.

Bei aliphatischen Polyestern hingegen spielt die Glastemperatur bei den üblichen Temperaturbereichen eines enzymatischen Abbaus keine Rolle, da alle Glastemperaturen der untersuchten aliphatischen Polyester unterhalb von ca.  $-20^\circ$  liegen und somit der Abstand von der Glastemperatur, bei der die Mobilität auch der amorph vorliegenden Ketten eingeschränkt wird, relativ groß ist und keinen signifikanten Einfluss mehr auf das Abbauverhalten hat.

Da eine Aussage zur Kristallinität der Nanopartikel aromatischer Homopolyester über die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Abbaurate aufgrund des oben beschriebenen Effektes nicht möglich ist, wurde versucht, Informationen zur Kristallinität aromatischer Nanopartikel über Versuche zur Abbaurate in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Nanopartikel zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 5-15 dargestellt.

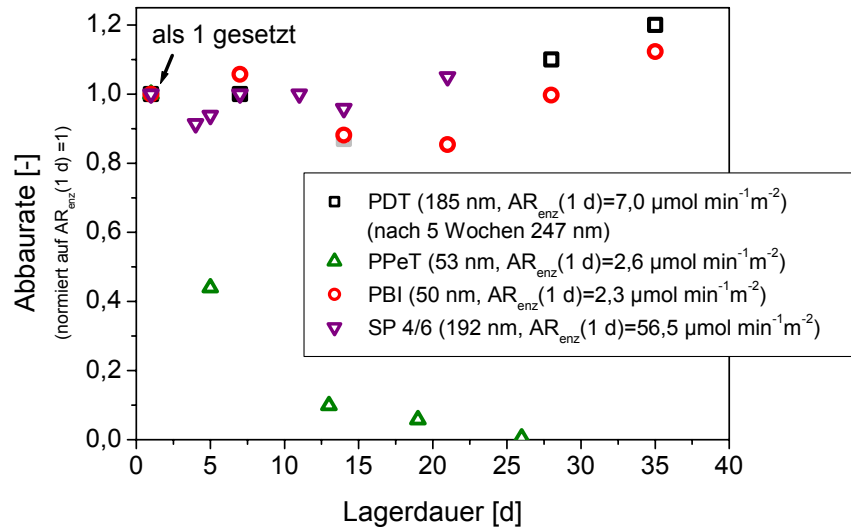


Abb. 5-15: Abhängigkeit der Abbaureate der Nanopartikel aromatischer Homopolyester von der Lagerdauer bei 23°C (Lipase aus *Pseudomonas species*, Abbautest durchgeführt bei 40°C). Zum Vergleich die Abhängigkeit der Abbaureate von SP 4/6-Nanopartikeln von der Lagerdauer bei 23°C (Lipase aus *Candida cylindracea*, Abbautest durchgeführt bei 40°C).  $AR_{enz}(1\text{ d})$  entspricht der enzymatischen Abbaureate nach einer Lagerdauer von einem Tag bei 23°C.

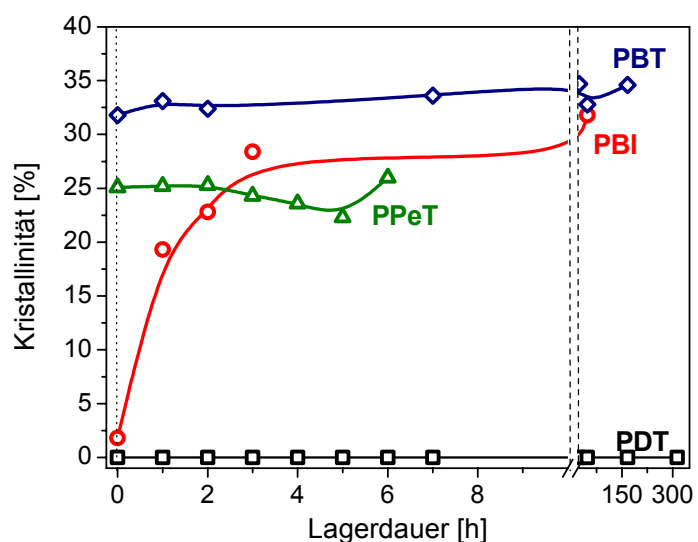
Im Gegensatz zu den Nanopartikeln der aliphatischen Homopolyester, bei denen das Abbauverhalten unverändert war, konnte bei dem aromatischen Homopolyester PPeT eine kontinuierliche Abnahme der Abbaureate mit der Lagerzeit der Nanopartikel beobachtet werden, bis nach ca. 4 Wochen keinerlei enzymatischer Abbau mehr erzielt werden konnte. Da eine Veränderung der verfügbaren Polyesteroberfläche z.B. durch Aggregation oder Ausfallen von Nanopartikeln ausgeschlossen werden konnte, ist die abnehmende Abbaugeschwindigkeit auf eine langsame Kristallisation des Polyesters in den Nanopartikeln zurückzuführen. Dies zeigt, dass auch in Nanopartikeln aromatischer Polyester ein im Vergleich z.B. von Filmen unterschiedliches Kristallisationsverhalten vorliegt. Die Ausbildung von Polymerkristallen in Nanopartikeln hängt hierbei offensichtlich stark von der Kristallisationsneigung der Polyester ab. Während PBI und PDT über 5 Wochen keinerlei Kristallisation, verbunden mit einer Abnahme der Abbaugeschwindigkeit zu beobachten war, erfolgt die Kristallisation von PBT auch in Nanopartikeln offensichtlich sehr schnell, sodass auch bei Einsatz von PBT-Nanopartikeln direkt nach der Herstellung kein enzymatischer Abbau zu beobachten ist. Die gute Kristallisierbarkeit von PBT ist auch in der Literatur beschrieben [CHISHOLM und ZIMMER 2000]. PPeT weist eine moderate Kristallisationsneigung auf, die einerseits zwischen PBI und PBT und andererseits zwischen PDT und PBT anzuordnen ist.



Ausgehend von den Ergebnissen der Untersuchungen zur Stabilität der Nanopartikel lässt sich bezüglich der Frage nach der Kristallinität der Partikel folgern, dass sowohl die Nanopartikel der aliphatischen Homopolyester als auch einiger aromatischer Homopolyester (PBI und PDT) amorph sind und dieser Zustand über Monate erhalten bleibt, wohingegen die Nanopartikel des PPeT langsam kristallisieren und die Kristallinität mit zunehmender Lagerdauer zunimmt.

Die oben erwähnte Kristallisationsneigung der Polyester lässt sich durch Bestimmung der Kristallisationsgeschwindigkeit aus DSC – Messungen quantifizieren. Hierbei wird genutzt, dass die Fläche unter dem Schmelzpeak der Schmelzenthalpie entspricht, die laut KONG und HAY (2002) ein Maß für die Kristallinität ist (s. Gleichung 5-31 in Kapitel 5.5.1). Nach der Gruppenbeitragstheorie [VAN KREVELEN 1990] lassen sich die Schmelzenthalpien der vollständig kristallinen Polyester und damit die Kristallinitäten berechnen (zur Berechnung s. Tabelle 8-2 im Anhang). Um die Kristallisationsgeschwindigkeiten zu bestimmen, wurden Filme der Polyester aufgeschmolzen, in flüssigem Stickstoff abgeschreckt und nach unterschiedlichen Lagerzeiten bei Raumtemperatur die Schmelzenthalpien mittels DSC-Messungen ermittelt.

Abb. 5-16:  
Abhängigkeit der Kristallinität  
(berechnet nach Gleichung 5-31)  
von der Lagerdauer der  
aufgeschmolzenen und in  
flüssigem Stickstoff  
abgeschreckten Filme ( $\varnothing = 0,5$   
cm) ermittelt aus DSC-Daten.



Die Ergebnisse in Abb. 5-16 zeigen, dass bei den Polyestern PBT und PPeT sofort die maximale Kristallinität erreicht wird, was auf eine relativ hohe Kristallisationsgeschwindigkeit dieser beiden Polyester zurückzuführen ist. Im Gegensatz hierzu kann bei PBI eine Steigerung der Kristallinität mit zunehmender Lagerdauer über einen Zeitraum von vier Stunden beobachtet werden. Bei dem aromatischen Homopolyester aus Diethylenglykol und Terephthalsäure (PDT) wird die geringste Kristallisationsgeschwindigkeit festgestellt. Dieser Polyester zeigt selbst nach einer Lagerdauer von acht Tagen keinen Schmelzpeak, was

darauf hindeutet, dass sich in dem Polyester während dieses Zeitraumes selbst in Filmen keine Kristalle ausbilden. Ausgehend von diesen Untersuchungen kann für die Kristallisationsgeschwindigkeit der Polyester folgende Reihenfolge festgestellt werden:

$$\text{PBT} \geq \text{PPeT} > \text{PBI} > \text{PDT}$$

Dieses Resultat spiegelt die Ergebnisse der Abbauraten in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Nanopartikel wider: Bei den Nanopartikeln des PBT konnte keine enzymatische Spaltung der Esterbindungen nachgewiesen werden. Diese Nanopartikel scheinen, aufgrund der hohen Kristallisationsgeschwindigkeit des PBT kristallin zu sein. Während die PPeT-Nanopartikel erst nach einigen Tagen Kristalle ausbilden, was durch eine Abnahme der Abbaurate deutlich wird, bleiben die Nanopartikel von PBI und PDT über Monate amorph (Konstanz der Abbauraten). Durch den Einbau von Isophthalsäure und Diethylenglykol wird demnach, wie bereits in der Literatur beschrieben, die Kristallinität und die Kristallisationsgeschwindigkeit von Polymeren verringert [BOUMA et al. 2001, FINELLI et al. 2001 a), FINELLI et al. 2001 b), KARAYANNIDIS et al. 2002, LI et al. 1999 a), LI et al. 1999 b), LOTTI et al. 2000, LOTTI et al. 2001, RIGHETTI et al. 1998].

Zusammenfassend kann für die aromatischen Homopolyester davon ausgegangen werden, dass im Gegensatz zu den Filmen, bei denen bei allen untersuchten aromatischen Polyestern kein enzymatischer Abbau nachzuweisen war, bei den Nanopartikeln ein differenziertes Verhalten vorliegt. Während bei den Nanopartikeln des PBT kein enzymatischer Abbau der Nanopartikel zu beobachten war, wurden Nanopartikel des PPeT, PBI, PDT und PDI von der Lipase aus *Pseudomonas species* innerhalb von 30 Minuten vollständig in wasserlösliche Oligomere überführt, wobei die Abbaurate der PPeT-Nanopartikel im Gegensatz zu den anderen Polyester-Nanopartikeln (Konstanz der Abbaurate) mit zunehmender Lagerdauer geringer wurde. Erklärt werden kann dieses unterschiedliche Abbauverhalten der Nanopartikel anhand der Kristallisationsneigung der Polyester.

Folglich ist die im Vergleich zu den Filmen geringere oder fehlende Kristallausbildung in den Nanopartikeln Voraussetzung für eine enzymatische Spaltung der Esterbindungen. Die hohe Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau aromatischer Polyester ist somit nicht direkt durch die chemische Struktur der Kette bedingt, sondern begründet sich in der fehlenden Kettenmobilität in den Kristallen, die durch den hohen Schmelzpunkt dieser Polyester bedingt ist.

### 5.5.3 Aliphatisch-aromatische Copolyester

Viele aliphatische Homopolyester sind zwar biologisch abbaubar, sind aber aufgrund ihrer Materialeigenschaften (geringe Schmelztemperatur und Zugfestigkeit) für eine technische Anwendung nicht geeignet. Aromatische Homopolyester hingegen besitzen gute thermische und mechanische Eigenschaften für einen weiten Bereich von Anwendungen, sind aber unter sinnvollen Polymer- und Umweltbedingungen nicht biologisch abbaubar [MÜLLER et al. 2001, STAPERT 1998]. Die Kombination der guten Eigenschaften der aromatischen Homopolyester mit der guten biologischen Abbaubarkeit der aliphatischen Homopolyester durch geeignete Copolymerisation führt zu biologisch abbaubaren Copolymeren mit guten Eigenschaften. Diese Copolyester finden breite Anwendungen (z.B. aliphatisch-aromatischer Copolyester Ecoflex® der BASF AG). Die biologische Abbaubarkeit von Copolyesterfilmen- und -pulvern wurde schon intensiv unter verschiedensten Umweltbedingungen untersucht [WITT 1996, MARTEN 2000, KLEEGERG 1999, VAN DER ZEE 1997, STAPERT 1998]. Diese Untersuchungen ergaben, dass mit steigendem Terephthalsäureanteil die Abbauraten sinken.

In den vorangegangenen Kapiteln zeigte sich, dass sich die kristalline Struktur und das Abbauverhalten der Nanopartikel von der in Filmen unterscheidet. Im Folgenden werden daher die Untersuchungen des Abbauverhaltens von Nanopartikeln aliphatisch-aromatischer Copolyester beschrieben.

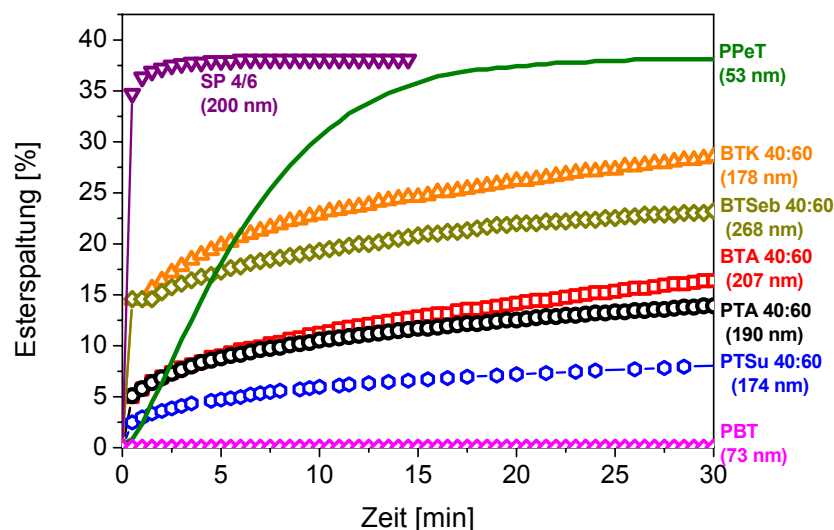


Abb. 5-17: Abbau von Nanopartikeln des aliphatischen Homopolyesters SP 4/6, der aromatischen Homopolyester PPeT und PBT und von Nanopartikeln aliphatisch-aromatischer Copolyester mit unterschiedlichen Monomerzusammensetzungen, aber konstantem Verhältnis von aliphatischer und aromatischer Komponente mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C.

Im Vergleich zum Verlauf des enzymatischen Abbaus an Nanopartikeln eines rein aromatischen Polyesters (PPeT) fällt bei den aliphatisch-aromatischen Copolyestern eine offensichtliche Zweiteilung in der Abbaucharakteristik auf (Abb. 5-17). Ein anfänglicher Bereich mit sehr hoher Abbaugeschwindigkeit wird gefolgt von einer Phase, in der ein sehr langsamer Abbau zu beobachten ist. Die Plateauphase, bei der die Nanopartikel vollständig solvatisiert sind, wird erst nach ca. 40 Stunden erreicht.

Die Zweiphasen-Charakteristik des Abbauverlaufes wird auch beim Vergleich der experimentell ermittelten Abbaukurve mit dem nach Gleichung 5-11 in Kapitel 5.3 beschriebenen Modell ( $X \sim t^3$ ) deutlich (Abb. 5-18)

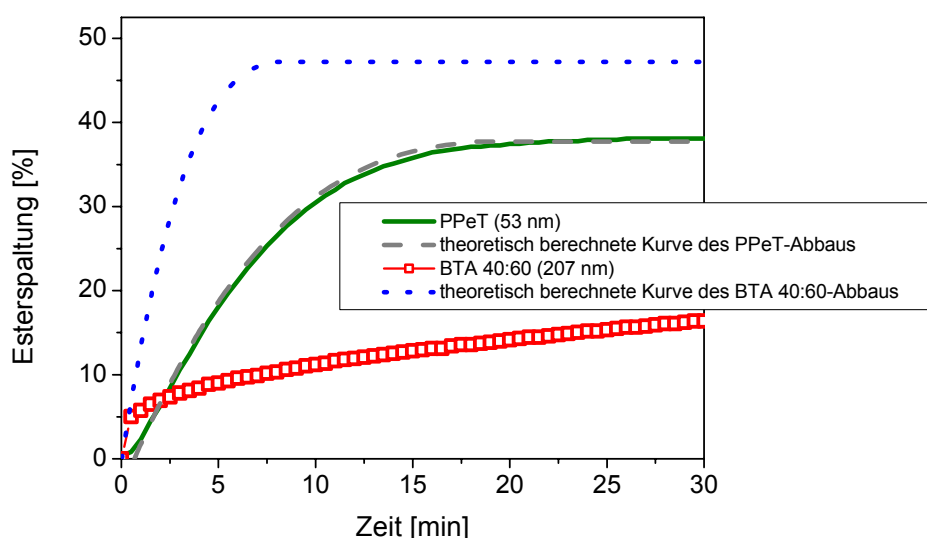


Abb. 5-18: Abbau von Nanopartikeln eines aromatischen Homopolyesters aus 1,5-Pentandiol und Terephthalsäure (PPeT) und von Nanopartikeln eines aliphatisch-aromatischen Copolyesters aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure (40 mol%) und Adipinsäure (60 mol%) (BTA 40:60) mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C. Die gestrichelten Linien entsprechen der aus der Abnahme der Partikeloberfläche theoretisch berechneten Abbaukurve (s. Kapitel 5.3).

Während für den Homopolyester PPeT eine sehr gute Übereinstimmung von theoretischem und experimentellen Kurvenverlauf gefunden wird, zeigt das Abbauverhalten der Copolyester deutliche Abweichungen von der theoretischen Vorhersage (als Parameter für die theoretischen Kurven gehen die Anfangsabbaugeschwindigkeit zum Zeitpunkt null sowie die Höhe des Plateaus ein). Im Gegensatz zum Abbau der Nanopartikel der aromatischen Homopolyester werden die Nanopartikel der Copolyester offensichtlich nicht gleichmäßig von der Oberfläche her abgetragen. Die zweiphasige Abbaucharakteristik könnte z.B. auf eine inhomogene Verteilung von aliphatischen und aromatischen Sequenzen oder von amorphen

und kristallinen Domänen innerhalb eines Nanopartikels begründet liegen. Im Folgenden werden zwei verschiedene Erklärungsansätze für die Zweiteilung der Abbaukurve diskutiert:

- 1) Schneller partieller Abbau aliphatischer Sequenzen des Copolyesters gefolgt von einem langsameren Abbau aromatischer Sequenzen.
- 2) Schneller partieller Abbau der amorphen Bereiche gefolgt von einem langsameren Abbau der kristallinen Domänen.

Zunächst sollte geprüft werden, ob die erste Stufe dem Abbau aliphatischer Domänen und die zweite Stufe dem Abbau aromatischer Sequenzen des Copolyester entspricht. Durch einen solchen Abbaumechanismus müsste es im Verlauf des Abbaus zu einer relativen Anreicherung aromatischer Monomere im Restpolymer kommen. In Tabelle 5-6 ist hierzu die Veränderung der Zusammensetzung von BTA 40:60-Nanopartikeln (aus  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen) während eines Abbauxperimentes gezeigt.

Tabelle 5-6: Prozentualer Stoffmengenanteil an Terephthalsäure ( $M_T$ ) und Adipinsäure ( $M_A$ ) eines Copolyesters BTA 40:60 vor und nach 5% Esterspaltung (Ende der ersten Stufe) der Nanopartikel ( $\varnothing=207$  nm) mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C.

Zusammensetzung ermittelt aus:	Vor Abbau		Nach Abbau	
	$M_T$ (mol%)	$M_A$ (mol%)	$M_T$ (mol%)	$M_A$ (mol%)
$^1\text{H-NMR}$ -Daten	40%	60%	44%	56%
Schmelzpunkt	40%	60%	45%	55%

Aus den  $^1\text{H-NMR}$ -Daten ist eine Erhöhung des Anteils aromatischer Gruppen eines BTA 40:60 Copolyesters um 4 mol% nach 5% Esterspaltung (Ende der 1. Stufe) festzustellen. Eine ähnliche Verschiebung der Zusammensetzung erhält man aus der Erhöhung des Schmelzpunktes für die Restsubstanz von 110°C auf 118°C unter Verwendung einer Beziehung zwischen Zusammensetzung und Schmelzpunkt, die von WITT (1996) aufgestellt wurde.

Die zwei Bereiche der Abbaukurven der aliphatisch-aromatischen Copolyester könnten folglich durch unterschiedliche Geschwindigkeiten des Abbaus von aliphatischen und aromatischen Sequenzen bedingt sein. Die erste Stufe entspräche dann vornehmlich dem Abbau der aliphatischen und die zweite Stufe dem der aromatischen Komponenten. Aus diesem Erklärungsansatz müsste folgen, dass die Höhe der ersten Stufe der Abbaukurve, d.h. deren Anteil an der gesamten Esterspaltung, mit ansteigender aliphatischer

Komponente im Copolyester zunimmt. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wurde das Abbauverhalten von Nanopartikeln verschiedener BTA-Copolyester mit unterschiedlichen stöchiometrischen Zusammensetzungen verglichen (s. Abb. 5-19).

Abb. 5-19:

Abhängigkeit der Höhe der ersten Stufe von der stöchiometrischen Zusammensetzung der BTA-Copolyester (Lipase aus *Pseudomonas species*, 40°C).

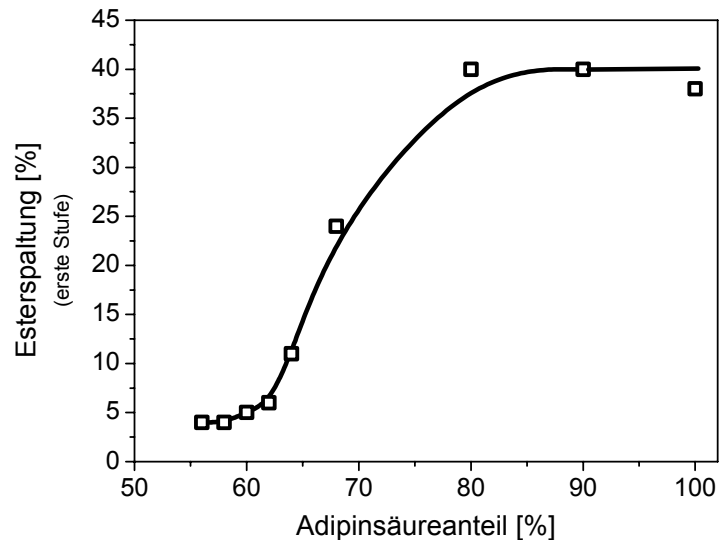
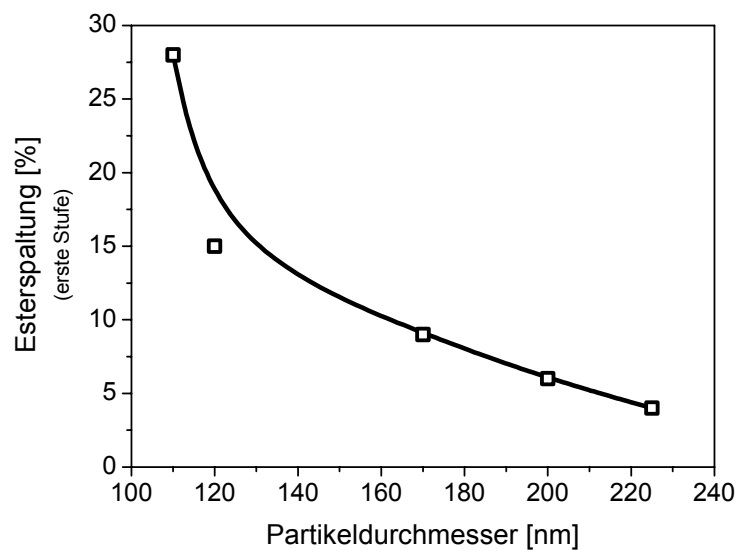


Abb. 5-19 zeigt die entsprechende Abhängigkeit der Höhe der ersten Stufe der Abbaukurve von dem Anteil an aliphatischer Komponente im Copolyester. Die zu beobachtende Zunahme der ersten Stufe der Abbaukurven mit zunehmendem Anteil aliphatischer Komponente in den Copolyestern entspricht den Erwartungen aus dem oben genannten Postulat.

Der Überlegung, dass die Zweiteilung der Kurve auf eine Trennung der aliphatischen und aromatischen Abbaugeschwindigkeiten zurückzuführen ist, steht jedoch gegenüber, dass bei einer Variation des Durchmessers der Nanopartikel *eines* Copolyesters mit konstanter stöchiometrischer Zusammensetzung (BTA 40:60) eine Zunahme der Höhe der ersten Stufe mit kleiner werdendem Partikeldurchmesser beobachtet wird (s. Abb. 5-20).

Abb. 5-20:

Einfluss des Partikel-  
durchmessers der  
Nanopartikel des BTA  
40:60 ( $m=0,7$  mg) auf die  
Höhe der ersten Stufe der  
Abbaukurve (Lipase aus  
*Pseudomonas species*,  
 $40^{\circ}\text{C}$ ).



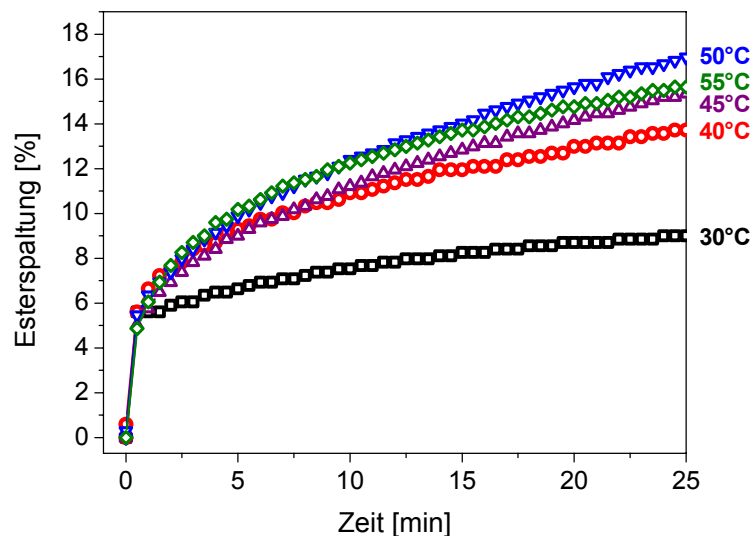
Da die stöchiometrische Zusammensetzung in den Nanopartikeln mit verschiedenen Durchmessern nicht variiert wurde, kann die beobachtete Abhängigkeit der Höhe der ersten Stufe nicht auf Unterschiede in den Abbaugeschwindigkeiten aliphatischer und aromatischer Domänen zurückgeführt werden.

Aufgrund der Beobachtungen beim Abbauverhalten von Nanopartikeln unterschiedlicher Größe ist der oben genannte zweite Erklärungsansatz zum Abbaumechanismus der Copolyester Nanopartikel näher in Betracht zu ziehen. Demnach sollte die Zweiteilung der Kurve in unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten amorpher und kristalliner Bereiche begründet liegen. Die erste Stufe kann dem Abbau der amorphen Bereiche zugeordnet werden, während die zweite Stufe dem Abbau der kristallinen Domänen entspricht. Im Gegensatz zu z.B. Copolyesterfilmen müsste hier der überwiegende Anteil des gesamten amorphen Bereiches des Materials direkt dem enzymatischen Angriff zugänglich sein.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Zweiteilung der Abbaukurve tatsächlich um die beschriebene Trennung von amorpher und kristalliner Abbaugeschwindigkeit handelt, wurde analog zu den Überlegungen aus Kapitel 5.5.1 die Abhängigkeit der Abbauraten der beiden Stufen von der Messtemperatur bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-21 dargestellt.

Abb. 5-21:

Temperaturabhängigkeit der Abbaugeschwindigkeiten beider Stufen beim Abbau von Nanopartikeln des Copolyesters BTA 40:60 ( $\varnothing=207$  nm) mit der Lipase aus *Pseudomonas species*.



Während die erste Stufe beim Abbau der Nanopartikel des Copolyesters BTA 40:60 nur eine Temperaturabhängigkeit aufweist, die der enzymatischen Aktivität (Spaltungsgeschwindigkeit niedermolekularer Ester,  $E_A \leq 25$  kJ mol<sup>-1</sup>) entspricht, ist die Temperaturabhängigkeit der Abbaurate der zweiten Stufe ( $E_A = 50$  kJ mol<sup>-1</sup>) doppelt so groß. Die Abnahme der Abbaurate der zweiten Stufe bei einer Messtemperatur von 55°C ist anhand der Abnahme der Enzymaktivität aufgrund einer Denaturierung der Proteinstruktur bei der hohen Messtemperatur zu erklären. Aus den Aktivierungsenergien kann gefolgert werden, dass die erste Stufe offensichtlich dem Abbau der amorphen und die zweite Stufe dem Abbau der kristallinen Domänen innerhalb eines Nanopartikels zuzuordnen ist.

Es stellt sich hier nun die Frage, warum beim enzymatischen Abbau der teilkristallinen Nanopartikeln der Copolyester eine Zweiteilung der Abbaukurve beobachtet wird, wohingegen der enzymatische Abbau von teilkristallinen Nanopartikeln z.B. des aromatischen Homopolyesters PPeT eine gleichförmige Abbaukurve zeigt. Hinweise hierzu können aus dem Verfilmungsverhalten von Copolyester-Nanopartikeln erhalten werden, die enzymatisch bis zum Ende der ersten schnellen Abbaustufe (vermuteter Abbau der amorphen Anteile) abgebaut wurden. In Abb. 5-22 sind rasterkraftmikroskopische (atomic force microscopy, AFM) Aufnahmen von eingetrockneten BTA-Nanopartikeln vor und nach einem partiellen Abbau gezeigt. Dabei wurde die Oberfläche mit einer feinen Spitze mechanisch abgetastet und eine topographische Karte der Probenoberfläche erstellt. Das Messprinzip ist in Abb. 8-16 im Anhang graphisch dargestellt.



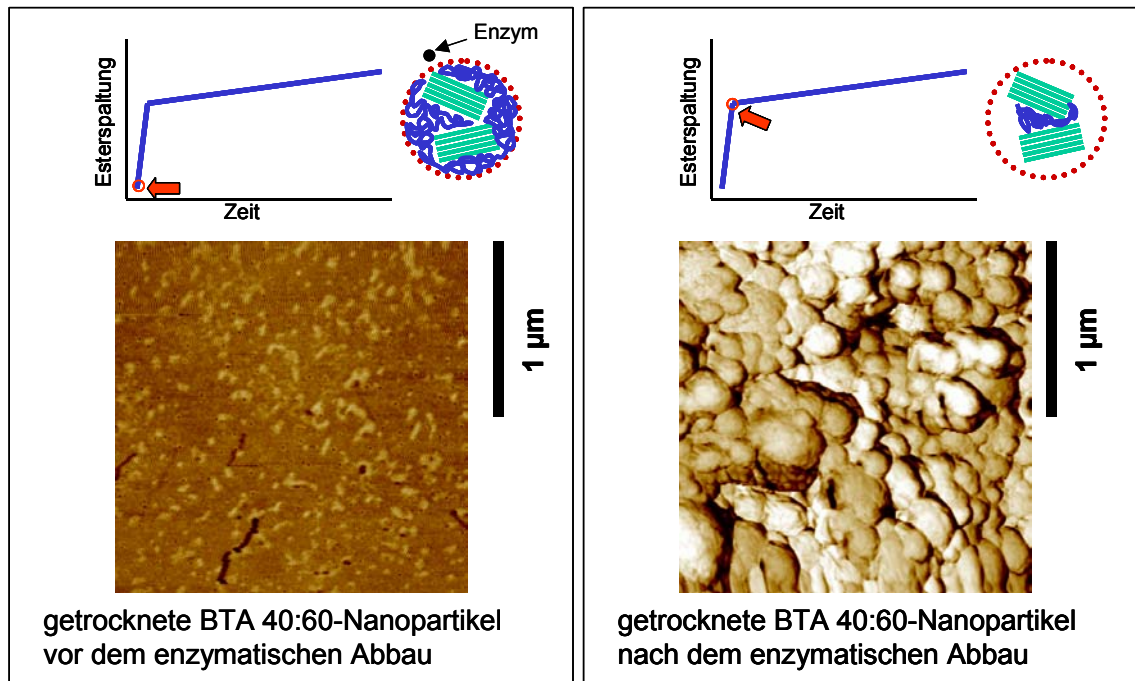


Abb. 5-22: AFM-Aufnahmen getrockneter Nanopartikel des Copolyester BTA 40:60 vor und nach einem partiellen enzymatischen Abbau mittels der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C.

Während native Nanopartikel beim Eintrocknen einen Film mit relativ glatter Oberfläche bilden, ist die Verfilmung teilabgebauter Nanopartikel signifikant schlechter. In den AFM-Aufnahmen sind deutlich partikuläre Strukturen zu erkennen, und der gebildete Film ist auch deutlich brüchiger als ein solcher aus nativen Partikeln.

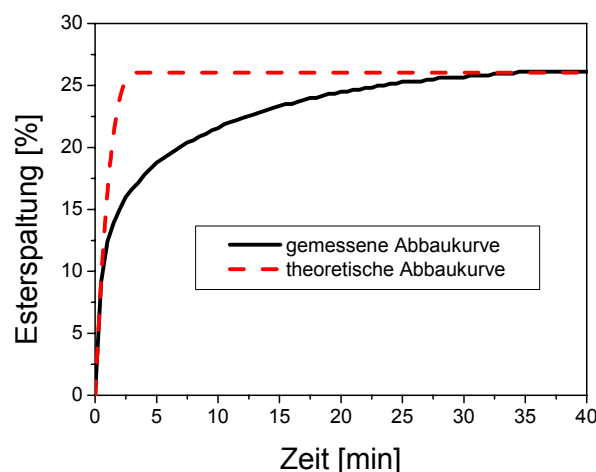
Polymersuspensionen im Nanometerbereich verfilmen aufgrund der Mobilität der Polymerketten in den amorphen Bereichen an der Partikeloberfläche. Die verminderte Filmbildung bei den teilabgebauten BTA 40:60 Partikeln kann nun dahingehend interpretiert werden, dass vornehmlich amorphe Bereiche an der Oberfläche depolymerisiert wurden, und ein Restpartikel übrigbleibt, der wahrscheinlich hauptsächlich aus kristallinem Material besteht, dass aufgrund der deutlich geringen Kettenmobilität in den Kristalliten [HYUN 2001] nicht diffus interpenetrieren kann und somit keinen kontinuierlichen Film bildet.

Dieses Resultat unterstützt die Vermutung, dass es sich bei der Zerteilung der Abbaukurve der Copolyester um eine Auftrennung amorpher und kristalliner Abbaugeschwindigkeiten handelt. Durch die Größenverhältnisse der Kristalldomänen speziell in den BTA Copolyester Partikeln ist der die Kristalle umgebende amorphe Anteil des Polyesters für das Enzym fast vollständig zugänglich und wird im Verlauf des Abbauxperiments nicht durch sich an der Oberfläche anreichernde, langsam abbauende Kristalle abgeschirmt. Hierdurch ist es möglich, die Abbaugeschwindigkeit amorpher und kristalliner Bereiche für diese Polymere in einem Experiment direkt zu bestimmen.

Wenn es sich bei der Aufspaltung der Abbaukurve in zwei Bereiche unterschiedlicher Abbaugeschwindigkeiten ausschließlich um unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten von amorphen und kristallinen Polymeranteilen handelt, dann dürften amorphe Copolyester keine Zweiteilung der Abbaukurve zeigen. In Abb. 5-23 ist die gemessene Abbaukurve eines amorphen Copolyesters aus Diethylenglykol, Isophthalsäure und Adipinsäure (DIA 80:20) im Vergleich mit der aus einem „shrinking core“ Modell unter der Annahme einer konstanten Reaktionskonstanten über den Abbauverlauf theoretisch berechneten Abbaukurve dargestellt (als Parameter für die theoretischen Kurven gehen die Anfangsabbau-geschwindigkeit zum Zeitpunkt null sowie die Höhe des Plateaus ein, s. Kapitel 5.3).

Abb. 5-23:

Abbauverhalten von Nanopartikeln eines amorphen Copolyester aus Diethylenglykol, Isophthalsäure und Adipinsäure (DIA 80:20,  $\varnothing=200$  nm) im enzymatischen Abbautest mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C. Die gestrichelte Linie entspricht der aus einem „shrinking-core“ Modell und unter Annahme einer konstanten Reaktionskonstanten über den Abbauverlauf theoretisch berechneten Abbaukurve für DIA 80:20 (s. Kapitel 5.3).



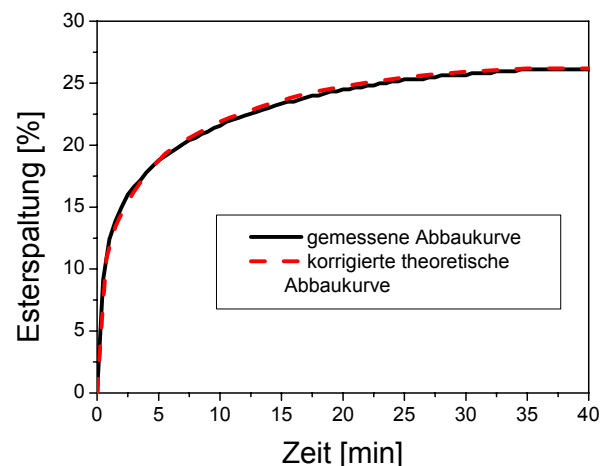
Die, wider Erwarten, schlechte Übereinstimmung der theoretischen und der experimentellen Abbaukurve der Nanopartikel des Copolyester (DIA 80:20), spricht wieder, analog den Nanopartikeln der teilkristallinen Copolyester, für eine Änderung der Reaktionskonstanten im Verlauf des Abbaus. Diese Beobachtung kann aber hier nicht, wie bei den teilkristallinen Copolyestern mit einer Trennung von amorpher und kristalliner Abbaurate erklärt werden, da der Copolyester (DIA 80:20) sogar als Film vollständig amorph ist.

Eventuell kann die Abweichung anhand von unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten der aliphatischen und aromatischen Domänen erklärt werden, denn die Lipase aus *Pseudomonas species* spaltet Esterbindungen amorpher aliphatischer Homopolyester deutlich schneller als Esterbindungen amorpher aromatischer Homopolyester (zum Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten s. Abb. 8-17 im Anhang). Unter dieser Voraussetzung ist denkbar, dass es, aufgrund der höheren Abbaugeschwindigkeit der aliphatischen

Estergruppen, zu einer kontinuierlichen Anreicherung aromatischer Esterbindungen kommt, deren enzymatische Hydrolyse deutlich langsamer verläuft. Dieses hat zur Folge, dass die Gesamtabbaugeschwindigkeit kontinuierlich reduziert wird. Wird diese Änderung der Reaktionskonstanten neben der Abnahme der Oberfläche in das Modell mit einbezogen, so lässt sich eine sehr gute Übereinstimmung der theoretisch berechneten und der experimentell beobachteten Abbaukurve erzielen (s. Abb. 5-24).

Abb. 5-24:

Abbauverhalten von Nanopartikeln eines amorphen Copolyester aus Diethylenglykol, Isophthalsäure und Adipinsäure (DIA 80:20,  $\varnothing=200$  nm) im enzymatischen Abbautest mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C. Die gestrichelte Linie entspricht der aus einem „shrinking-core“ Modell theoretischen berechneten Abbaukurve für DIA 80:20, korrigiert bezüglich der Änderung der Reaktionskonstanten, aufgrund der Anreicherung der aromatischen Esterbindungen.



Eine optimale Anpassung der theoretischen Kurve ist dann gegeben, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit im Verlauf der Abbaureaktion bis auf einen Wert reduziert wird, der ca. 2% der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit entspricht. Der Faktor von ca. 50 zwischen Anfangs- und Endreaktionsgeschwindigkeit entspricht ungefähr dem Verhältnis der Abbaugeschwindigkeiten von amorphen aliphatischen Homopolyestern (PDA) und amorphen aromatischen Homopolyestern (PDI).

Die Kurvenform des amorphen aromatischen Polyesters in Abb. 5-24 zeigt weiterhin, dass die Trennung der aliphatischen und aromatischen Abbaugeschwindigkeiten nicht so scharf ist, wie die Trennung der amorphen und kristallinen Abbaugeschwindigkeiten bei den teilkristallinen Copolyestern. Dies liegt darin begründet, dass eine strikte Isolierung der aliphatischen und aromatischen Sequenzen aufgrund ihrer festen Position innerhalb der Polymerketten nicht möglich ist.

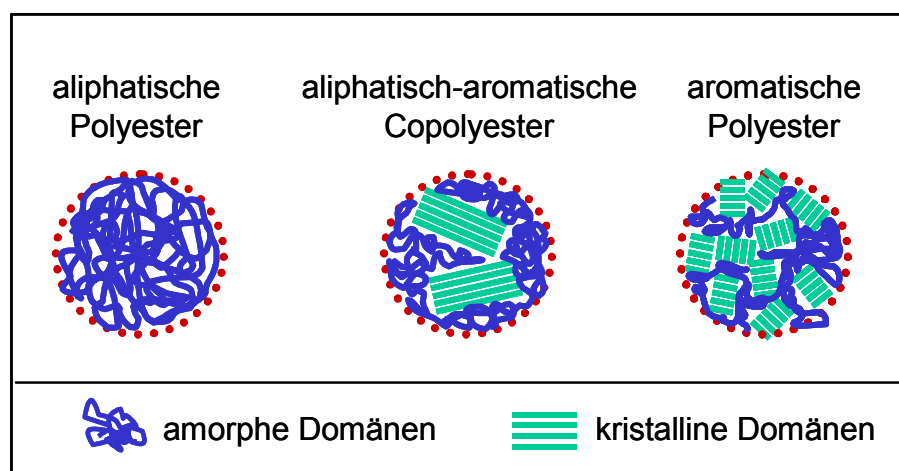
## Fazit

An Nanopartikeln teilkristalliner aliphatisch-aromatischer Copolyester lässt sich in ein und demselben Abbauxperiment sowohl die Abbaugeschwindigkeit kristalliner als auch amorpher Domänen bestimmen. Die weitgehend vollständige Zugänglichkeit der schneller abbauenden amorphen Bereiche ist offensichtlich durch eine besondere Kristallcharakteristik in den Nanopartikeln bedingt. Unterschiede in den Spaltungsgeschwindigkeiten der aliphatischen und aromatischen Esterbindungen wird in teilkristallinen Copolyestern durch den Effekt der eingeschränkten Kettenmobilität in den kristallinen Bereichen überdeckt, kann jedoch in speziellen vollständig amorphen aliphatisch-aromatischen Copolyestern nachgewiesen werden.

### 5.5.4 Modellvorstellung zur Kristallinität der Nanopartikel

Aus den vorgestellten Ergebnissen der Abbauntersuchungen an Nanopartikeln konnte folgendes Modell bezüglich der Kristallstruktur der Polyester in Nanopartikel postuliert werden (s. Abb. 5-25).

Abb. 5-25:  
Modellvorstellung  
zur kristallinen  
Struktur der  
Polyester-  
Nanopartikel.



Die Ergebnisse zum Abbau an Nanopartikeln aliphatischer Homopolyester, wie z.B. die Temperaturabhängigkeiten der Abbauraten, sprechen dafür, dass diese Nanopartikel amorph sind. In den Nanopartikeln werden auch in einem Zeitraum von sechs Monaten keine Kristalle gebildet, was anhand der konstanten Abbauraten von SP 4/6-Nanopartikeln gezeigt wurde.

Eine Erklärung für die Stabilität des amorphen Zustandes der Nanopartikel der aliphatischen Homopolyester ist die Hinderung der Keimbildung aufgrund der kleinen Dimensionen des Nanopartikels. Generell wird in der Literatur berichtet, dass sich die molekulare Organisation in ultradünnen Filmen (Filmdicke <100 nm) und in dünnen Filmen (Filmdicke zwischen 100

nm und 1000 nm) stark von der in größeren Ausdehnungen unterscheidet [LOO et al. 2000]. Es wurde dabei gezeigt, dass neben der Kristallinität auch die Kristallisationsgeschwindigkeit stark gestört werden kann. Publiziert wurden entsprechende Beobachtungen ebenfalls von FRANK et al. (1996) und DESPOTOPOULOU et al. (1996). Sie zeigten, dass die Kristallisation von Poly(di-n-hexyl silan) in ultradünnen Filmen gehindert ist.

Erklärt wurde diese Hinderung der Kristallitbildung von SCHULTZ (1996) anhand der geringen Anzahl der Kristallisationskeime, die sich in diesen ultradünnen Filmen ausbilden können. So nimmt laut HOROWITZ und SANDERS (1994) die Kristallisationsgeschwindigkeit in Partikeln ab, je kleiner die Partikel werden. Vorgestellt wurden diese Überlegungen anhand von Partikeln aus Polyhydroxybuttersäure (PHB), die mit einem Durchmesser von 0,1-1 µm im Mikroorganismus vollständig amorph vorliegen. Es tritt auch keine Kristallisation bei Temperaturen auf, bei denen Filme des PHB kristallisieren würden [HOROWITZ et al. 1999]. Diese Stabilität der amorphen Phase wurde auf Basis der Keimbildungsrate des PHB erklärt (s. Gleichung 5-32).

$$\frac{n}{n_0} = 1 - e^{-Iv t}$$

Gleichung 5-32

$$\frac{n}{n_0} = \text{kristallisierter Anteil an der Gesamtpolymermasse}$$

$I$  = Keimbildungsrate

$t$  = Zeitdauer

$v$  = Partikelvolumen

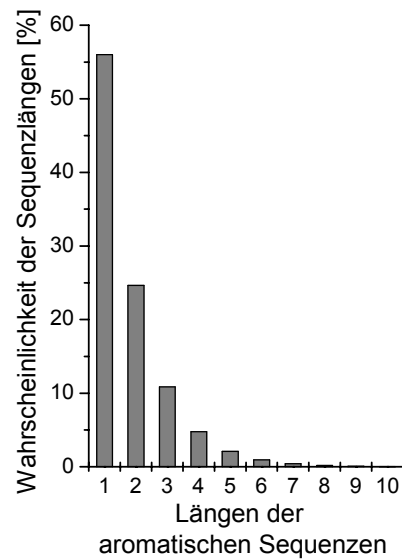
Für die Kristallisation dieser PHB-Partikel ergibt sich mit einer Keimbildungsrate von  $I=2,5$  events  $\text{mm}^{-3} \text{s}^{-1}$  und einem Partikeldurchmesser von 250 nm eine Zeitdauer von über 1000 Jahren, bis die Partikel kristallisieren [DE KONING und LEMSTRA 1992].

Eine weitere Erklärung für die fehlende Kristallitbildung könnte darin liegen, dass die minimale Kettenlänge, die notwendig ist, um Kristalle auszubilden größer ist als der Durchmesser eines Nanopartikels. Diese Vermutung steht aber im Widerspruch zu Literaturdaten. HECK et al. publizierten 2001, dass die Kristallite von Polycaprolacton nur eine Größe von ca. 7 nm aufweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden von GAN et al. (2001) für den aliphatischen Homopolyester Poly(tetratmethylen succinat) (SP 4/4) gefunden. Demnach weist SP 4/4 Kristallstrukturen mit einer Dicke von 3-6 nm auf. Diese Dimensionen sind entschieden kleiner als ein Nanopartikel mit einem Durchmesser von z.B. 200 nm, was dahingehend interpretiert werden kann, dass theoretisch eine Kristallbildung innerhalb der Partikel möglich sein müsste. Aufgrund dieser Daten wird eine Hinderung der Kristallitbildung durch die Kristallitgröße für unwahrscheinlich angesehen.



Abb. 5-27:

Abnahme der Wahrscheinlichkeit des Vorkommens längerer aromatischer Sequenzen in einem statistischen Copolyester BTA 44:56 mit einem Terephthalsäureanteil von 44 mol%.



Die Wahrscheinlichkeit für ein Vorkommen längerer aromatischer Sequenzen nimmt schnell mit zunehmender Sequenzlänge ab. Von insgesamt 100 aromatischen Sequenzen liegen in den Molekülketten des BTA 44:56 im Durchschnitt 56 Einer-, 25 Zweier-, 11 Dreier- und nur noch 5 Vierersequenzen vor.

Laut KUWABARA et al. (2002) bilden die Aromaten Kristalldomänen mit einer Länge von 3 nm aus, was einer Länge von ca. 6 aromatischen Sequenzen entspricht. Da aber statistisch nur eine Sechsersequenz pro 100 aromatischen Sequenzen vorhanden ist, entspricht die Masse dieser Sechsersequenzen ca. 2% der Gesamtmasse, was demnach einer Kristallinität von nur 2% entspricht. Vor dem Hintergrund, dass der Copolyester BTA 44:56 eine Kristallinität von ca. 20% aufweist [YAMAMOTO 2002], ist das von KUWABARA et al. (2002) vorgestellte Modell schwer vorstellbar.

Neben diesen Kristallstrukturen mit einem Durchmesser von weniger als 3 nm, beobachtete KUWABARA et al. (2002) zusätzlich Strukturen mit einem Durchmesser von 100 nm, die aber nicht näher definiert wurden. Diese Kristalle passen gut in das in Abb. 5-25 bezüglich der kristallinen Struktur der Nanopartikel der Copolyester postulierte Modell.

Im Gegensatz zu den Nanopartikeln der aliphatisch-aromatischen sind die Nanopartikel der aromatischen Homopolyester PBI, PDT und PDI amorph. Es werden wahrscheinlich aufgrund der geringen Kristallisationsgeschwindigkeiten keine Kristalle ausgebildet. Im Gegensatz dazu kristallisieren Nanopartikel des PPeT, wobei die Kristallinität mit zunehmender Lagerdauer der Partikel zunimmt. Diese Kristallisation kann auf die hohe Kristallisationsgeschwindigkeit des PPeT im Vergleich zu PBI, PDI und PDT zurückgeführt werden. Die sich ausbildenden Kristalle sind im Gegensatz zu den Kristallen der Copolyester

wahrscheinlich viel kleiner als der Durchmesser eines Nanopartikels. Die Existenz so klein dimensionierter Kristalle wurde bereits in der Literatur beschrieben. GAN et al. (2001) publizierten, dass der aliphatische Homopolyester SP 4/4 Kristalle mit einer Größe von 3-6 nm aufweist. KUWABARA et al. (2002) beschrieben kleine kristalline Strukturen von 3 nm in aliphatisch-aromatischen Copolyestern BTA 44:56.

Um die Frage zu beantworten, warum sich die Größen der Kristalle unterscheiden, wird im Folgenden das Kristallisationsverhalten der Polyester verglichen. Dazu wird untersucht, inwieweit die Kristallbildung vom Polymerisationsgrad  $P_w$

$$P_w = \frac{M_w}{M_{Rep}}$$

Gleichung 5-33

$P_w$  = Polymerisationsgrad

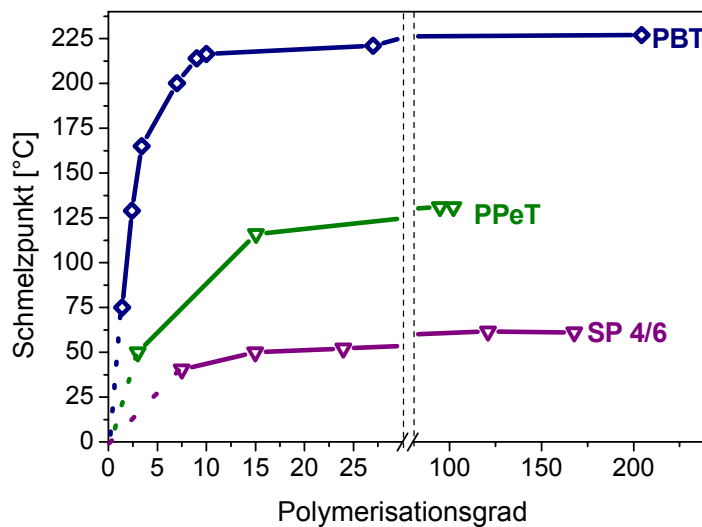
$M_w$  = Gewichtsmittel des Molekulargewichtes [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

$M_{Rep}$  = Molekulargewicht des Ausgangsmonomeren (Repeating unit) [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

und damit von der Kettenlänge des Polymeren abhängt.

Abb. 5-28:

Abhängigkeit des Schmelzpunktes vom Polymerisationsgrad. (SP 4/6-Oligomere mit einem Polymerisationsgrad von 4.5 zeigen keinen Schmelzpeak, wohingegen bei PPeT-Oligomeren mit einem Polymerisationsgrad von 3 ein Schmelzpeak bei 50°C und bei einem PBT-Monomer ein Schmelzpeak bei 75°C beobachtet wird.)




Bei dem aromatischen Homopolyester aus 1,4-Butandiol und Terephthalsäure (PBT) sind bereits Oligomere mit einem Polymerisationsgrad von 1,5 (d.h. BTB) in der Lage Kristallite auszubilden (Schmelzpeak der Monomere bei 75°C) [HÄSSLIN et al. 1980]. Ob dies für den anderen aromatischen Homopolyester (PPeT) auch gilt, konnte experimentell nicht verifiziert werden, da hier keine einzelnen Repeating Units zur Verfügung standen. Dennoch kann geschlussfolgert werden, dass ebenfalls kurze Ketten des PPeT ausreichend sind, um



Kristalle auszubilden, da schon bei Oligomeren mit einem Polymerisationsgrad von 3 (Trimeren) eine Kristallisation der Ketten beobachtet wird ( $T_m=50^\circ\text{C}$ ). Im Gegensatz dazu kristallisieren Oligomere des aliphatischen Homopolyesters SP 4/6 sogar mit einem Polymerisationsgrad von 4,5 nicht aus (kein Schmelzpeak in der DSC-Kurve). Und erst ab einem Polymerisationsgrad von 7 wird eine Kristallisation beobachtet ( $T_m=40^\circ\text{C}$ ). Folglich sind bei dem aliphatischen Homopolyester SP 4/6 längere Ketten für eine Kristallitbildung notwendig als bei den aromatischen Homopolyestern. Analoge Untersuchungen bezüglich des Kristallisationsverhaltens von Copolyestern konnten nicht durchgeführt werden, da eine „Mindestkettenlänge“ vorliegen muss, damit überhaupt von einem statistischen Copolyester gesprochen werden kann.

Erklärt werden können die oben beschriebenen Unterschiede im Kristallisationsverhalten dahingehend, dass starke zwischenmolekulare Kräfte, wie z.B. zwischen den aromatischen Ringen der aromatischen Homopolyester, die zur Ausbildung von Kristallisationskeimen notwendige Anordnung von Polymerketten unterstützen [COWIE 1997]. Diese zwischenmolekularen Kräfte spiegeln sich in der Schmelzenthalpie ( $\Delta H_m$ ) des Polyesters wider. In Tabelle 5-7 sind die Beiträge verschiedener chemischer Struktureinheiten zur Schmelzenthalpie nach VAN KREVELEN (1990) dargestellt.

Tabelle 5-7: Beitrag verschiedener chemischer Strukturen zur Schmelzenthalpie [VAN KREVELEN 1990]

Gruppe	Beitrag zu $\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
	17
-COO-	-2,5
-CH <sub>2</sub> -	4

Die aromatischen Strukturelemente, wie sie in PBT und PPeT zu finden sind, liefern einen größeren Beitrag zur Schmelzenthalpie als die aliphatischen Komponenten, welche sogar einen negativen Beitrag zur Schmelzenthalpie liefern, d.h. sie verstärken eine Abstoßung der Polymerketten [VAN KREVELEN 1990]. Diese Ergebnisse stützen ebenfalls die oben bereits beschriebene höhere „Kristallisationsfähigkeit“ aromatischer Homopolyester im Vergleich zu aliphatischen Homopolyestern.

Abschließend muss festgehalten werden, dass das in Abb. 5-25 vorgestellte Modell bezüglich der kristallinen Struktur der Polyester-Nanopartikel letztendlich ein Postulat bleibt, das zwar durch die eigenen Daten gestützt wird, aber nur teilweise mit Literaturdaten in Einklang zu bringen ist.

## 5.6 Abbau teilkristalliner Polyester

In der Literatur wurden bereits Abbauuntersuchungen an Filmen aliphatischer Homopolyester beschrieben [WITT 1996, YOO und IM 1999, MARTEN 2000, TOKIWA et al. 1990, TOKIWA et al. 1988, TOKIWA und SUZUKI 1981, TOKIWA und SUZUKI 1978, TOKIWA und SUZUKI 1977 b)]. Dabei wurden deutliche Unterschiede in den Abbaugeschwindigkeiten festgestellt. WITT (1996) und TOKIWA et al. (1990) korrelierten diese Unterschiede der Abbauraten mit den Schmelzpunkten der Polyester: Die Abbaugeschwindigkeit ist umso höher, je geringer der Schmelzpunkt des Polyesters ist. MARTEN (2000) erweiterte diese Korrelation dahingehend, dass die Abbaugeschwindigkeit weniger eine Funktion des absoluten Polyesterschmelzpunktes ist, als vielmehr eine Funktion der Differenz von Polyesterschmelzpunkt ( $T_m$ ) und der Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}}$ ). Ist diese Temperaturdifferenz ( $T_m - T_{\text{Mess}}$ ) größer als 40°C, dann ist kaum ein enzymatischer Abbau der Polyesterfilme zu detektieren. Erst ab einer Temperaturdifferenz ( $T_m - T_{\text{Mess}}$ ) kleiner als 30°C steigen die Abbauraten der Polyester, wie in Abb. 5-29 dargestellt, stark an.

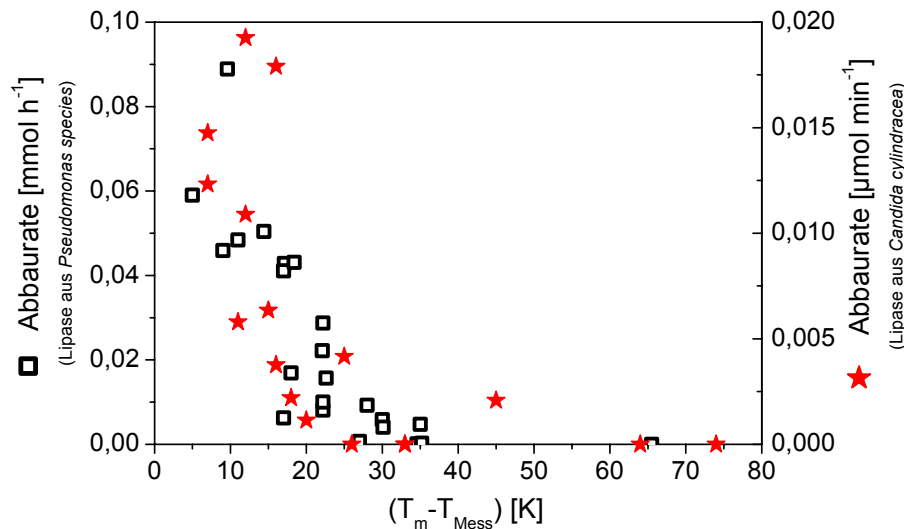


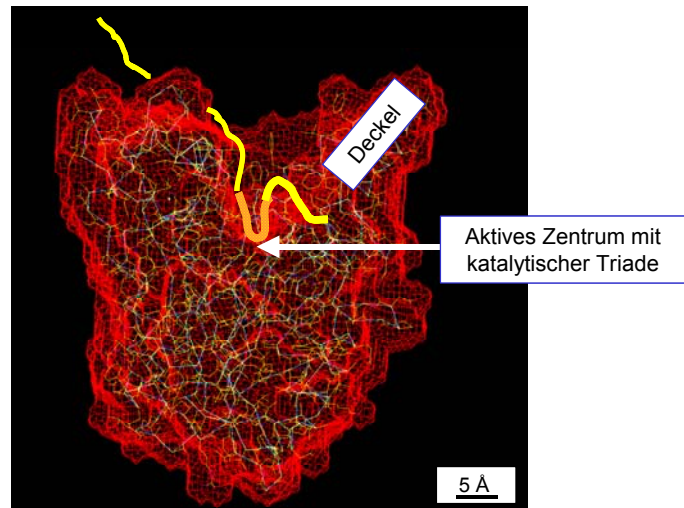
Abb. 5-29: Vergrößerung der enzymatischen Abbauraten von Filmen aliphatischer Homopolyester bei Verringerung der Differenz zwischen Polyesterschmelzpunkt ( $T_m$ ) und Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}}$ ). Abbau mittels der Lipase aus *Pseudomonas species* (linke Ordinatenachse) [MARTEN 2000] und der Lipase aus *Candida cylindracea* (rechte Ordinatenachse). Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Ordinaten.

Obwohl unterschiedliche Lipasen (Lipase aus *Pseudomonas species* und Lipase aus *Candida cylindracea*) bei den Abbauuntersuchungen verwendet wurden, stimmen die Abbauraten der Filme aliphatischer Homopolyester tendenziell überein: bei einer Temperaturdifferenz ( $T_m - T_{\text{Mess}}$ ) kleiner als 30°C steigen die Abbauraten der Polyester stark an. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Ordinaten. Die absolute Abbaugeschwindigkeit der Filme mit der Lipase aus *Pseudomonas species* ist um den Faktor 750 größer als die mit der Lipase aus *Candida cylindracea*. Eine Erklärung hierfür liegt in den unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der beiden Lipasen. So weist die Lipase aus *Pseudomonas species* eine höhere spezifische Aktivität gegenüber Triglyceriden (Triolein und Triacetin) auf als die Lipase aus *Candida cylindracea*, was sich in den absoluten Abbaugeschwindigkeiten der Filme widerspiegelt.

Bei einer Verringerung der Differenz von Polyesterschmelzpunkt ( $T_m$ ) und der Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}}$ ) steigen die Abbauraten stark an. Laut MARTEN (2000) ist somit das thermische Verhalten der kristallinen Bereiche für die Abbaugeschwindigkeit entscheidend. Da die Spaltung der Esterbindungen im Zentrum der Lipase stattfindet, müssen die Polymerketten über eine „Mindestmobilität“ verfügen, um zumindest teilweise in die Enzymstruktur eindringen zu können, und um die für die Spaltung notwendige Positionierung am aktiven Zentrum der Lipase zu ermöglichen (s. Abb. 5-30).

Abb. 5-30:

Schematischer Einbau einer Polymerkette (gelb) in den trogförmigen Zugangsbereich des aktiven Zentrums der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* [MARTEN 2000].



Die temperaturabhängige Verringerung der zwischen den Polymerketten der Kristalle wirksamen Anziehungskräfte und die damit verbundene Zunahme der Kettenmobilität am Polyesterschmelzpunkt kontrolliert die Abbaugeschwindigkeit der teilkristallinen Polyesterfilme.

MARTEN (2000) entwickelte für den enzymatischen Abbau von teilkristallinen Polymerfilmen aus diesen Überlegungen das in Abb. 5-31 vorgestellte Modell.

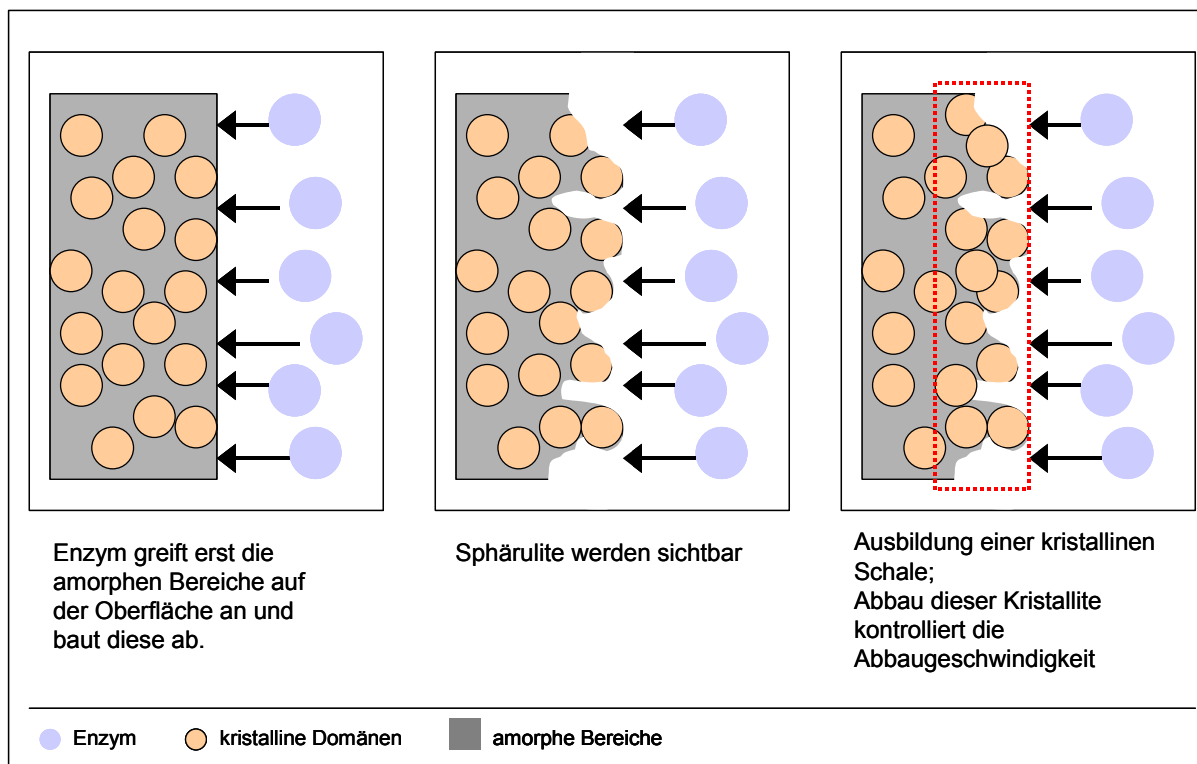


Abb. 5-31: Modell zur Beschreibung des enzymatischen Abbaus von teilkristallinen Polyesterfilmen in Anlehnung an MARTEN (2000).

Wie in der Literatur beschrieben [YOO und IM 1999, IWATA und DOI 1999], werden zunächst die amorphen Bereiche des teilkristallinen Polymerfilmes angegriffen, deren enzymatischer Abbau deutlich schneller verläuft als der der kristallinen Bereiche. Diese schnellere enzymatische Hydrolyse der amorphen Bereiche führt zu einer Anreicherung der kristallinen Domänen an der Polymeroberfläche. Aufgrund der Verkrustung der Oberfläche mit Sphäroliten, sind die amorphen Bereiche nicht mehr für das Enzym verfügbar. Es folgt der langsamere enzymatische Abbau der kristallinen Bereiche, bis wieder amorphe Domänen für das Enzym zugänglich geworden sind. Aus diesen Überlegungen resultiert die in Abb. 5-32 dargestellte Abbaukurve.

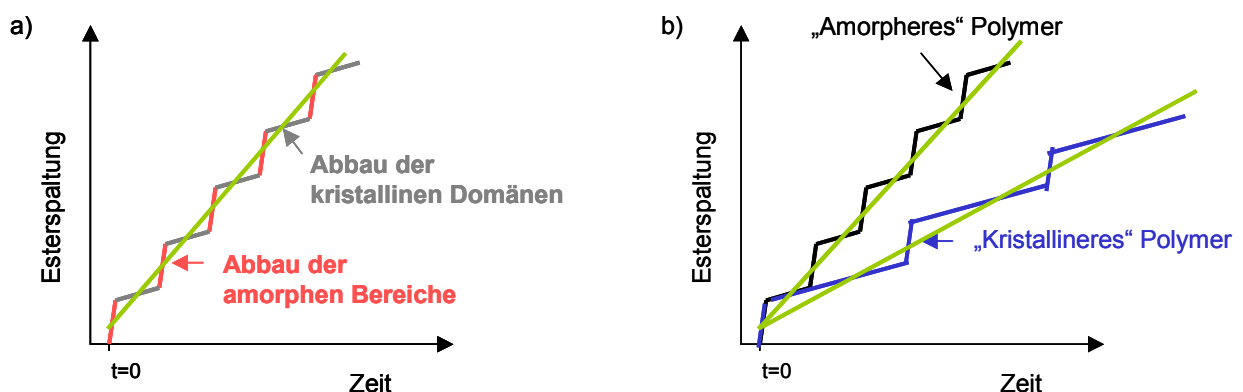


Abb. 5-32: a) Aus dem oben vorgestellten Modell resultierende Abbaukurve: Schneller Abbau der amorphen Bereiche, gefolgt von einem langsameren Abbau der kristallinen Domänen.

b) Abbaukurven zweier Polyester unterschiedlicher Kristallinitäten.

Wie bereits beschrieben, erfolgt zunächst der schnellere Abbau der amorphen Bereiche (in Abb. 5-32 a) als rote Linie gekennzeichnet) und anschließend der Abbau der kristallinen Domänen (in Abb. 5-32 a) als graue Linie gekennzeichnet). Da es üblicherweise in enzymatischen Abbautests mit Filmen nicht möglich ist, diese beiden Abbaugeschwindigkeiten getrennt zu erfassen, entspricht die gemessene Abbaukurve dem Mittelwert der beiden Abbaugeschwindigkeiten (s. grüne Linien in Abb. 5-32 a und b).

Prinzipiell ist es nun, im Gegensatz zum enzymatischen Abbau an Polyesterfilmen, anhand von Abbauuntersuchungen an Nanopartikeln aliphatisch-aromatischer Copolyester möglich, die Abbaugeschwindigkeiten amorpher (z.B. BTA 40:60:  $v_{\text{am}}=43,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) und kristalliner Bereiche (z.B. BTA 40:60:  $v_{\text{krist}}=1,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) getrennt und in einem Experiment zu bestimmen. Die Nanopartikel dieser Copolyester zeigen eine Zweiteilung der Abbaucharakteristik auf: ein anfänglicher Bereich mit einer sehr hohen Abbaugeschwindigkeit wird gefolgt von einer Phase mit deutlich geringerer

Abbaugeschwindigkeit. Wie Ergebnisse weiterer Untersuchungen, z.B. Abhängigkeit der Abbaurates der einzelnen Stufen von der Messtemperatur, gezeigt haben, handelt es sich bei dieser Zerteilung um eine Trennung des Abbaus der amorphen und der kristallinen Bereiche innerhalb eines Nanopartikels. Durch die Größenverhältnisse der Kristalldomänen ist der die Kristalle umgebende amorphe Anteil des Polyesters für das Enzym fast vollständig zugänglich, was die getrennte Bestimmung der Abbaugeschwindigkeiten ermöglicht.

Die Gesamtabbaugeschwindigkeit der Filme ergibt sich aus den folgenden Gleichungen. So ist die Anzahl der Esterbindungen ist Gleichung 5-34 gegeben durch.

$$n_{EB} = \rho_{EB} V$$

Gleichung 5-34

$n_{EB}$  = Anzahl der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB}$ ]

$\rho_{EB}$  = Dichte der Esterbindungen [ $\text{mol}_{EB} \text{ cm}^{-3}$ ]

$V$  = Volumen [ $\text{cm}^3$ ]

Die Abnahme der Anzahl der Esterbindungen, d.h. die Abbaugeschwindigkeit des Polymerfilmes berechnet sich folglich nach Gleichung 5-35.

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = -\rho_{EB} \frac{dV}{dt}$$

Gleichung 5-35

$t$  = Zeit [min]

Unter der Annahme, dass sich das Gesamtvolumen des Polymerfilmes ( $V$ ) aus einem amorphen Volumenanteil und einem kristallinen Volumenanteil zusammensetzt, gilt

$$-\frac{dn_{EB}}{dt} = -\rho_{EB} \left( \frac{dV_{am}}{dt} + \frac{dV_{krist}}{dt} \right)$$

Gleichung 5-36

$V_{am}$  = Volumen des amorphen Polymermaterials [ $\text{cm}^3$ ]

$V_{krist}$  = Volumen des kristallinen Polymermaterials [ $\text{cm}^3$ ]

Mit der Einführung von  $\varphi$

$$\varphi = \frac{V_{am}}{V}$$

Gleichung 5-37

lässt sich Gleichung 5-36, da  $\varphi$  keine Konstante ist, sondern abhängig von  $V$  und  $t$ , umschreiben zu

$$\boxed{-\frac{dn_{EB}}{dt} = -\rho_{EB} \left( \left( \frac{d\phi V}{dt} \right)_{am} + \left( \frac{d(1-\phi)V}{dt} \right)_{krist} \right)}$$
Gleichung 5-38

$$\Leftrightarrow \boxed{-\frac{dn_{EB}}{dt} = -\rho_{EB} \left( \left( V \frac{d\phi}{dt} + \phi \frac{dV}{dt} \right)_{am} + \left( V \frac{d(1-\phi)}{dt} + (1-\phi) \frac{dV}{dt} \right)_{krist} \right)}$$
Gleichung 5-39

Diese Gleichung kann anhand der vorhandenen Messdaten nicht eindeutig gelöst werden.

Eine weitere nicht genau anzugebende Größe in Gleichung 5-39 stellen die amorphen und kristallinen Volumenanteile (die Kristallinität) der Polymerprobe dar, denn die Kristallinität von Polymerfilmen ist sehr komplex und wird von folgenden Faktoren maßgeblich beeinflusst:

- a) Von den Kristallisationsbedingungen, d.h. thermodynamische Größen wie Temperatur und Druck oder der Geschwindigkeit des Abkühlens. Die Kristallinität eines Polymeren ist immer eine Funktion seiner thermischen Vorgeschichte [TIEKE 1997].
- b) Von der Messmethode: je nach der verwendeten Messmethode können für das gleiche Polymer verschiedene Kristallinitäten ermittelt werden [ELIAS 1981]. In Tabelle 5-8 sind einige Kristallinitäten in Abhängigkeit von der Messmethode für Cellulose dargestellt.

Tabelle 5-8: Vergleich der nach verschiedenen Messmethoden erhaltenen Kristallinitäten für Cellulose [ELIAS 1981]

Messmethode	Kristallinität [%]
Hydrolyse	93
Formylierung	87
Röntgenographie	80
Dichte	60

Erschwerend kommt für Copolyester noch deren komplexe Kristallstruktur hinzu [KUWABARA et al. 2002]. Theoretisch sind drei verschiedene Kristalltypen vorstellbar: a) Kristalle aus aromatischen Monomeren, b) Kristalle aus aliphatischen Monomeren und c) „Mischkristalle“. Neben diesen drei verschiedenen Kristalltypen existieren noch die amorphen Domänen. Darüber hinaus ist die Frage offen, ob die Kristalle in den Nanopartikeln denen der Filme entsprechen oder ob eventuell andere kristalline Strukturen bzw. Kristallinitäten vorliegen.

## 5.7 Abbau amorpher Polyester

In diesem Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, welche Faktoren die Abbaugeschwindigkeit von Polyesterbindungen bestimmen, die nicht in kristalline Strukturen eingebettet sind.

Die Vermeidung kristalliner Strukturen in den Materialien, deren Einfluss üblicherweise alle anderen Effekte überdeckt, kann auf zwei unterschiedliche Arten erreicht werden:

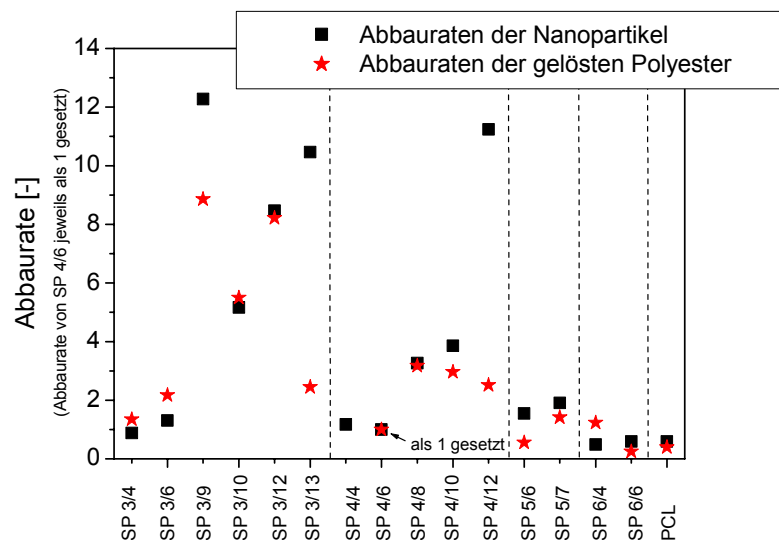
- a) Abbau von Polyester-Nanopartikeln im Enzymunterschuss. Bei vielen Polyester-Nanopartikeln ist, wie in Kapitel 5.5.1 gezeigt, die Ausbildung von Kristallen gehindert sodass auch bei teilkristallinen Polyestern zumindest temporär rein amorphe Materialien erhalten werden können. Durch den Enzymunterschuss ist die Abbaurate unabhängig von der verfügbaren Polyesteroberfläche.
- b) Bestimmung der enzymatischen Abbauraten von in geeigneten organischen Lösungsmitteln gelösten Polyestern (s. Kapitel 4.8). In Lösung liegen keine zwischenmolekulare Wechselwirkungen wie in kristallinen Strukturen vor. Auch hier wird im Enzymunterschuss gearbeitet, um den Einfluss der Oberfläche auszublenden. Die organischen Lösemittel werden für den Enzymtest in Wasser emulgiert.

Um die Abbauraten der Nanopartikel und der gelösten Polyester miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Abbauraten jeweils auf die für SP 4/6 gemessenen Abbauraten bezogen. Die so normierten Abbaugeschwindigkeiten sind in Abb. 5-33 dargestellt.



Abb. 5-33:

Vergleich der Abbauraten aliphatischer Homopolyester mit der Lipase aus *Candida cylindracea* bei 40°C. Abbauraten ermittelt aus den Anfangssteigungen der Abbaukurven der Nanopartikel im Enzymunterschuss und aus den Anfangssteigungen der Abbaukurven der gelösten Polyester.



Wie aus Abb. 5-33 zu ersehen ist, korrelieren die Abbauraten der Nanopartikel mit denen der gelösten Polyester, bis auf zwei Ausnahmen (SP 3/13 und SP 4/12). Sowohl bei SP 3/13 als auch bei SP 4/12 ist die Abbauraten der Nanopartikel deutlich größer als die der gelösten Polyester. Aufgrund der ansonsten guten Übereinstimmung, kann davon ausgegangen werden, dass die Polyester in den Nanopartikeln tatsächlich vollständig amorph vorliegen.

Die Abweichungen der Abbauraten des SP 3/13 und SP 4/12 können anhand des Abbauprofils der Nanopartikel dieser Polyester interpretiert werden, da beim Abbau der Nanopartikel zwei Bereiche unterschiedlicher Abbaugeschwindigkeiten auftreten: ein anfänglicher Bereich mit hoher Abbaugeschwindigkeit gefolgt von einer Phase, in der ein langsamerer Abbau zu beobachten ist (s. Abb. 8-20 im Anhang). Mögliche Ursache für diese Zweiteilung könnte zum einen, analog zum Abbau der Nanopartikel der teilkristallinen aliphatisch-aromatischen Copolyester, eine getrennte Erfassung von Abbauvorgängen in amorphen und kristallinen Materialbereichen sein, zum anderen können Probleme bei der Ablösung der bei der Hydrolyse entstehenden langkettigen Dicarbonsäure-Salze von der Feststoffoberfläche die zweigeteilte Abbaukurve bedingen.

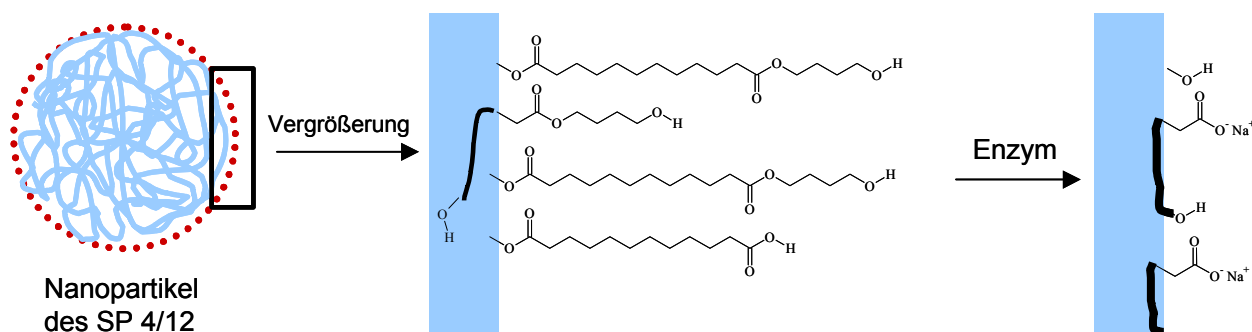


Abb. 5-34: Modell zur Passivierung der Oberfläche durch die verlangsamte Ablösung von z.B. Dodecandisäure durch hydrophobe Wechselwirkungen.

Der erste schnelle Bereich der Abbaukurve ist dann durch die zunächst schnelle Ablösung der aus dem Partikel herausragenden Polymerketten zu erklären. Im weiteren Verlauf der Hydrolyse der Esterbindungen ist denkbar, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten der gebildeten Säuren (11 bzw. 10 Methylengruppen) und der Feststoffoberfläche den Ablöseprozess kinetisch verzögern. Eine solche Passivierung der Oberfläche würde den enzymatischen Abbau der darunter liegenden Polyesterketten aus sterischen Gründen verlangsamen, was die langsamere Abbaugeschwindigkeit der zweiten Stufe begründen würde. Diese Passivierung wurde bereits von MARTEN (2000) für den Abbau von SP 4/12-Filmen vermutet. Eine ähnliche Hinderung der Abbaugeschwindigkeit aufgrund der langsamen Ablösegeschwindigkeit der Ketten aus den Tropfen der gelösten Polyester ist vorstellbar. Da die in Abb. 5-33 dargestellten Abbauraten der ersten Stufe des enzymatischen Abbaus der Nanopartikel und damit der „freien“ Polymerketten entsprechen, sind diese größer als die Abbauraten der gelösten Polyester, welche der „gehemmten“ Abbaugeschwindigkeit entsprechen.

Temperaturabhängige Messungen haben gezeigt, dass die Abbaurate der zweiten Stufe mit steigender Messtemperatur zunimmt (s. Abb. 8-11 im Anhang). Diese Abhängigkeit könnte zum einen auf eine Zunahme der Ablösegeschwindigkeit der Dicarbonsäure mit zunehmender Temperatur hinweisen. Zum anderen kann diese Temperaturabhängigkeit der Abbaurate der zweiten Stufe analog zu den Überlegungen bezüglich der Temperaturabhängigkeiten der Abbaugeschwindigkeiten der teilkristallinen Nanopartikel aliphatisch-aromatischer Copolyester dahingehend gedeutet werden, dass es sich um den Abbau der kristallinen Bereiche innerhalb des Partikels handelt, sodass die Zweiteilung der Abbaukurve dann auf eine Trennung amorpher und kristalliner Abbauraten zurückzuführen wäre. Eine eindeutige Interpretation der Zweiteilung der Abbaukurve ist anhand dieser Messergebnisse nicht möglich.

Zusätzlich zu der guten Korrelation der Abbauraten der Nanopartikel und der gelösten Polyester, ist eine Zunahme der Abbauraten mit zunehmender Länge der Dicarbonsäure zu beobachten (Abb. 5-35). Diese Unterschiede in den Abbauraten wurden ebenfalls für teilkristalline Polyesterfilme, die bei der gleichen Differenz zwischen Schmelz- und Messtemperatur enzymatisch hydrolysiert wurden, gefunden, obwohl hier laut MARTEN (2000) eine ähnliche Abbaurate der kristallinen Bereiche zu erwarten war. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-35 für aliphatische Homopolyester mit 1,4-Butandiol als Diolkomponente und unterschiedlicher Dicarbonsäuren graphisch dargestellt.

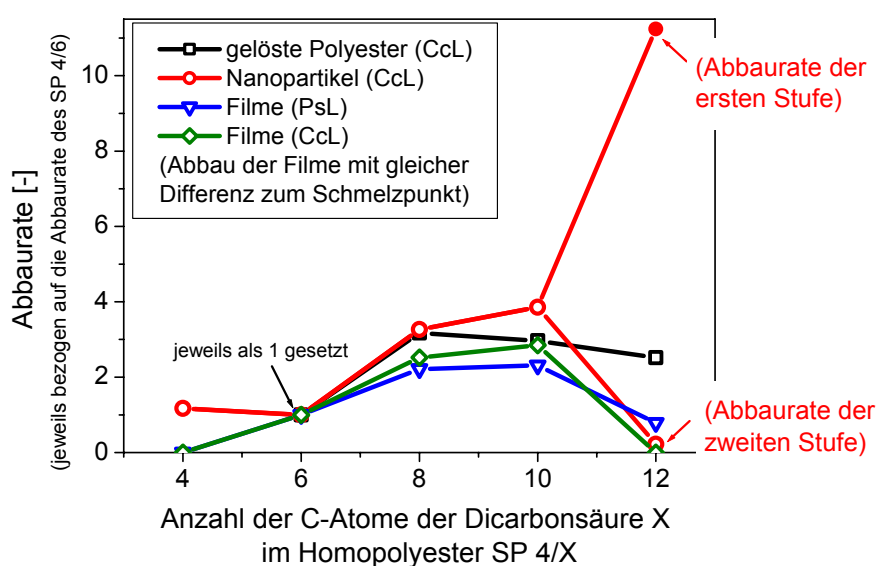


Abb. 5-35: Vergleich der Abbauraten aliphatischer Homopolyester aus 1,4-Butandiol und verschiedener Dicarbonsäuren X (4=Bernsteinsäure, 6=Adipinsäure, 8=Korksäure, 10=Sebacinsäure, 12=Dodecandisäure). Die Abbauraten wurden aus den Steigungen der Abbaukurven ermittelt a) der gelösten Polyester (die Abbaurate des gelösten SP 4/4 konnte nicht bestimmt werden, da dieser Polyester unlöslich in Toluol ist), b) der Nanopartikel und c) der Filme (die Messtemperatur wurde so gewählt, dass die gleiche Differenz zwischen Mess- und Polyesterschmelztemperatur vorlag).

Bei den beobachteten Unterschieden der Abbauraten sowohl der Filme bei gleicher Differenz zwischen Schmelz- und Messtemperatur als auch der amorphen Nanopartikel und der gelösten Polyester sind die Einflüsse der kristallinen Domänen, die normalerweise die Abbaugeschwindigkeit bevorzugt beeinflussen, ausgeblendet und es treten hier weitere, nachgeordnete Einflussgrößen hervor, die den enzymatischen Abbau der Polyester kontrollieren. Vier weitere Einflussfaktoren werden im Folgenden diskutiert.

JAEGER et al. (1994) beschreiben den enzymatischen Abbau von Polyestern als sogenannte „Grenzflächen“-Michaelis-Menten-Kinetik, wobei die Konzentration der

Esterbindungen an der Oberfläche der Substratkonzentration entspricht. Demnach sollte die Abbaugeschwindigkeit mit steigender Konzentration der Esterbindungen an der Oberfläche zunehmen. Experimentell wurde aber die gegenläufige Tendenz gefunden: die Esterbindungen der Nanopartikel und des gelösten SP 3/10 (Konzentration der Esterbindungen =  $8,25 \text{ mmol g}^{-1}$ ) wurden fünfmal schneller enzymatisch hydrolysiert als die des SP 3/4 (Konzentration der Esterbindungen =  $12,64 \text{ mmol g}^{-1}$ ). Vor diesem Hintergrund wird ein dominierender Einfluss der Konzentration der Esterbindungen auf die Abbaugeschwindigkeit amorpher Polyester-Nanopartikel ausgeschlossen.

Ein weiterer Faktor, der die Abbaugeschwindigkeit amorpher Polyester beeinflussen kann, ist das Adsorptionsverhalten der Lipase auf der Polyesteroberfläche. Es ist bekannt, dass Lipasen erst durch Kontakt zu einer hydrophoben Oberfläche aktiviert werden, und es ist zu vermuten, dass die Adsorption der Lipasen auf einer hydrophoberen Oberfläche der aus langkettigen Monomeren aufgebauten Polyestern (z.B. SP 4/12) gegenüber der auf der hydrophileren Oberfläche der aus kurzkettigen Monomeren aufgebauten Polyestern (z.B. SP 4/6) begünstigt ist. Hieraus würde eine höhere Abbaugeschwindigkeit bei hydrophoben Polyestern (Monomere mit langen  $\text{CH}_2$ -Ketten) resultieren.

Eine dritte mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Abbauraten der amorphen Polyester könnten Unterschiede in den Stabilitäten der Esterbindungen sein. Zur Quantifizierung dieses Effektes, wurde versucht, die rein chemische Hydrolyse der Polyester zu ermitteln. Bei Filmen ( $\varnothing = 1,8 \text{ cm}$ ,  $A = 5,09 \text{ cm}^2$ ) konnte allerdings selbst nach 6 Monaten Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 4, pH 7, pH 9) keine signifikante Hydrolyse der Polyester festgestellt werden (s. Abb. 8-21 im Anhang). Ebenfalls keine charakteristischen Ergebnisse wurden durch die Verwendung von Polyester-Nanopartikeln bei einem pH-Wert von 7 erzielt. Eine Bestimmung der chemischen Hydrolyse der Nanopartikel der Polyester bei pH 4 bzw. pH 9 war nicht möglich, da die Nanopartikel-Suspensionen bei diesen pH-Werten ausflockten. Zusammengefasst bedeutet dies, dass Unterschiede in den Stabilitäten der Esterbindungen durch die verwendeten Messmethoden nicht bestimmt werden konnten.

Neben den drei bereits diskutierten möglichen Einflussparametern kann die Mobilität der Polymerketten auch im amorphen, nicht geordneten Zustand als Grund für die unterschiedlichen Abbauraten diskutiert werden. Wie bereits in Kapitel 5.6 diskutiert, müssen die Polymerketten über eine gewisse Mobilität verfügen, um überhaupt in das aktive Zentrum der Lipase zu gelangen. Laut MARTEN (2000) wird die Abbaugeschwindigkeit teilkristalliner Polyester hauptsächlich durch die Differenz aus Polyesterschmelzpunkt und Messtemperatur determiniert, was mit der unter Annäherung an den Schmelzpunkt sinkenden Stärke der zwischenmolekularen Kräfte im Kristall unter gleichzeitigem Anstieg der Kettenmobilität erklärt wurde. Bei amorphen Polyestern, wie z.B. den Polyester-Nanopartikeln, kann diese Kettenmobilität analog anhand der Differenz aus Mess- und Glas temperatur charakterisiert

werden, da bei der Glas-temperatur die Rotationsbewegung der Monomersegmente in der Kette eingefroren werden und die Mobilität der Ketten signifikant erniedrigt wird (Glaszustand) [TIEKE 1997].

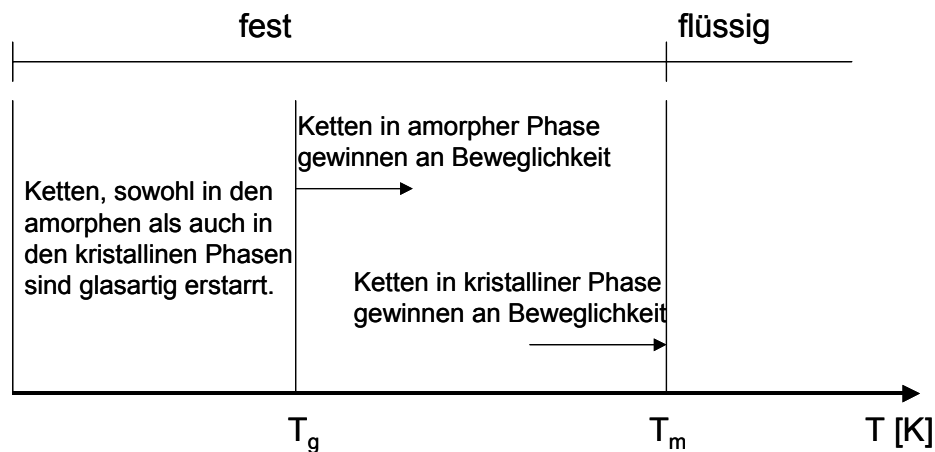


Abb. 5-36: Abhängigkeit der Kettenbeweglichkeit von der Glas- und der Schmelztemperatur eines beliebigen Polymeren.

Bei einer Verringerung der Differenz zwischen Mess- und Glas-temperatur wird folglich die Mobilität der Polymerketten in den amorphen Bereichen reduziert. Bei den untersuchten aliphatischen Polyestern liegen die Glas-temperaturen alle unterhalb von ca.  $-20^{\circ}\text{C}$ . Somit ist der Abstand der Glas-temperatur und der Hydrolysetemperatur relativ groß und es ist kein signifikanter Einfluss mehr auf das Abbauverhalten zu erwarten. Die beobachteten Unterschiede in den Abbaugeschwindigkeiten der SP 4/x-Polyester kann somit auch auf den klassischen Effekt der Substratspezifität der Enzym-Substratwechselwirkung zurückgeführt werden, d.h. die unterschiedlichen Abbauraten ergeben sich daraus, wie gut sich die direkte molekulare Umgebung der jeweiligen Esterbindungen in das aktive Zentrum des Enzyms (Lipase) einpassen kann und wie gut dementsprechend die katalytische Wirkung durch Absenkung der Aktivierungsenergie ist.

Im Gegensatz zu den Nanopartikeln aliphatischer Homopolyester liegen die Glas-temperaturen der aromatischen Homopolyester mit  $10^{\circ}\text{C}$  bis  $75^{\circ}\text{C}$  in dem üblichen Temperaturbereich eines enzymatischen Abbaus. Hier ist der Abstand von Mess- und Glas-temperatur und damit die Mobilität der Ketten der amorphen Bereiche somit relativ gering und kann daher einen signifikanten Einfluss auf das Abbauverhalten der Polyester-Nanopartikel haben. Um diese Annahme zu überprüfen, sind in Abb. 5-37 die enzymatischen Abbauraten mittels der Lipase aus *Pseudomonas species* und in Abb. 5-38 die

enzymatischen Abbauraten mittels der Lipase aus *Candida cylindracea* amorpher Nanopartikel in Abhängigkeit von der Differenz aus Mess- und Glasübergangstemperatur dargestellt.

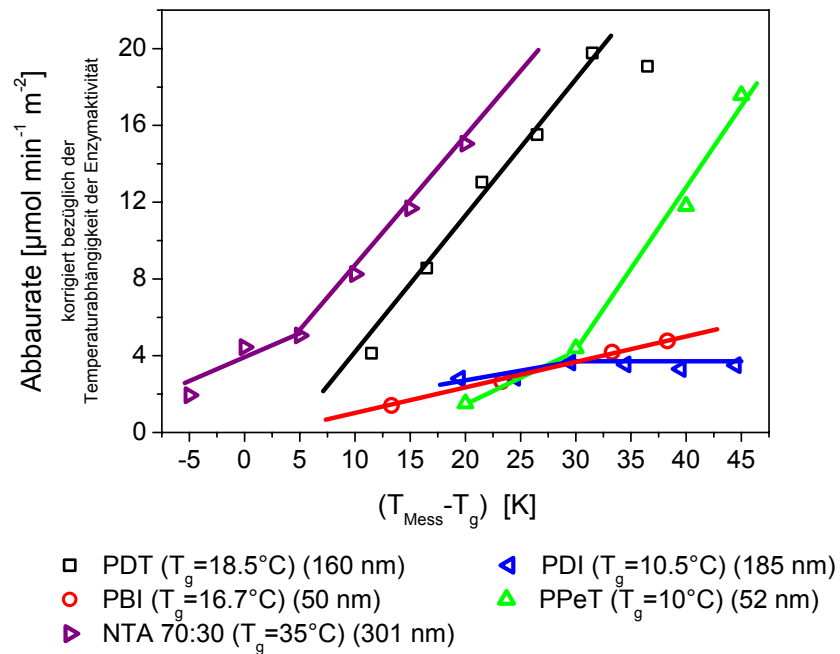


Abb. 5-37: Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Abbauraten (Lipase aus *Pseudomonas species*) amorpher Nanopartikel aromatischer Homopolyester und aliphatisch-aromatischer Copolyester in Abhängigkeit von der Differenz aus Mess- und Glasübergangstemperatur ( $T_{\text{Mess}} - T_g$ ). (Abbaureaten korrigiert bezüglich der Enzymaktivität bei verschiedenen Temperaturen, s. Kapitel 4.9).

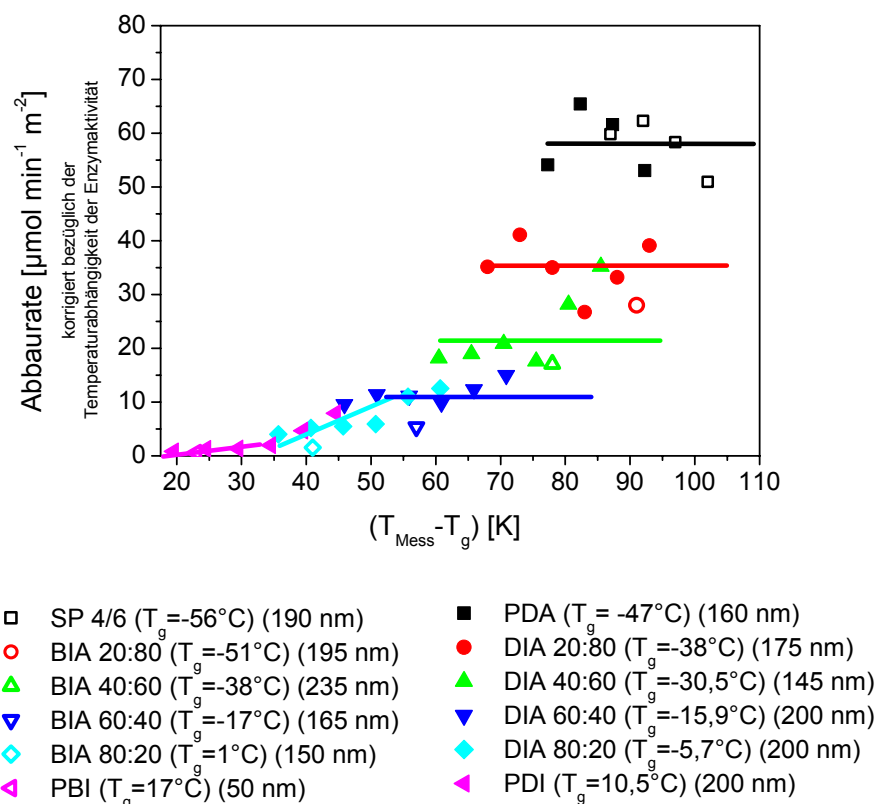


Abb. 5-38: Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Abbauraten (Lipase aus *Candida cylindracea*) amorpher Nanopartikel aliphatischer Homopolyester und aliphatisch-aromatischer Copolyester in Abhängigkeit von der Differenz aus Mess- und Glasübergangstemperatur ( $T_{\text{Mess}} - T_g$ ). (Abbauraten korrigiert bezüglich der Enzymaktivität bei verschiedenen Temperaturen, s. Kapitel 4.9).

Analog zur Abbaureate teilkristalliner Polyester nimmt auch die Abbaugeschwindigkeit amorpher Polyester mit zunehmender Mobilität der Polymerketten (Erhöhung der Differenz aus Mess- und Glastemperatur ( $T_{\text{Mess}} - T_g$ )) deutlich zu. Ab einer Messtemperatur, die ca. 50°C oberhalb der Glastemperatur liegt, ist die Abbaugeschwindigkeit allerdings unabhängig von der Messtemperatur (s. Abb. 5-38 b). Hier wird die Abbaugeschwindigkeit analog zu den Abbauraten der aliphatischen Homopolyester durch nicht näher zu belegende substratspezifische Faktoren bestimmt.

Die Korrelation der Abbauraten mit ( $T_{\text{Mess}} - T_g$ ) ist jedoch nicht so eindeutig wie der von MARTEN (2000) vorgestellte Zusammenhang zwischen der Abbaureate teilkristalliner Filme und der Differenz aus Schmelz- und Messtemperatur. Es handelt sich bei der Glastemperatur nicht, wie beim Kristallisieren, um ein sprunghaftes „Einrasten“ der Moleküle zu einer Anordnung minimaler potentieller Energie, sondern vielmehr um ein allmähliches Einfrieren der Molekularbewegungen [VOLLMERT 1988]. Weiterhin ist in der Literatur bereits beschrieben, dass sich die Glasübergangstemperatur feuchter Systeme von denen trockener

Substanzen deutlich unterscheiden kann. SCATENA et al. publizierten bereits 1968 eine Abnahme der Glasübergangstemperatur von feuchten Polyvinylacetaten um 6°C pro Gewichtsprozent Wasser, das in der Polymermatrix aufgenommen ist, und LEE et al. (1997) beobachteten eine um 6°C bis 22°C niedrigere Glasübergangstemperatur bei nassen Latizes im Vergleich zu trockenen.

Darüber hinaus wird die Glasübergangstemperatur von der Dimension des Polyesters beeinflusst. WANG und ZHOU (2002) beobachteten eine Abnahme der Glasübergangstemperatur um 15°C bei ultradünnen Filmen (Filmdicke=40 nm) hoch vernetzter Polymere im Vergleich zu Proben größerer Ausdehnung. Eine ähnliche Abhängigkeit der Glasübergangstemperatur von der Filmdicke wurde ebenfalls von KIM et al. (2000) bei dünnen Poly( $\alpha$ -methylstyrol)-Filmen berichtet. KIM et al. (2000) fanden eine Abnahme der Glasübergangstemperatur um 23°C, wenn die Filmdicke von 150 nm auf 15 nm erniedrigt wird.

Somit ist es nicht exakt möglich die tatsächlichen Glasübergangstemperaturen der Polyester innerhalb der Nanopartikel unter Testbedingungen anzugeben und es ist anzunehmen, dass sich die in der DSC ermittelten Daten signifikant von den  $T_g$ -Werten unterscheiden, die während des enzymatischen Abbaus in wässriger Umgebung vorliegen. Deshalb ist die Korrelation der Abbauraten mit  $(T_{\text{Mess}} - T_g)$  nicht so eindeutig wie die von MARTEN (2000) vorgestellte Beziehung zwischen der Abbauraten teilkristalliner Polyester und der Differenz aus Schmelz- und Messtemperatur. Dennoch ist klar eine Steigerung der Abbauraten mit zunehmender Kettenmobilität (zunehmender Differenz aus Mess- und Glasübergangstemperatur) auch bei rein amorphen Materialien festzustellen, wobei jedoch der Einfluss der Temperatur in amorphen Systemen in der Nähe der Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) deutlich geringer ist als bei teilkristallinen Polymeren in der Nähe des Polyesterschmelzpunktes ( $T_m$ ).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in amorphen Materialien eine Abhängigkeit der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit von der Kettenmobilität zu beobachten ist. Die Kettenmobilität amorpher Materialien korreliert mit der Temperaturdifferenz zwischen Glasübergangstemperatur und Abbautemperatur ( $T_{\text{Mess}} - T_g$ ). Bei ausreichend hoher Kettenmobilität ist bei amorphen Polymeren dann der normalerweise untergeordnete Effekt der enzymatischen Substratspezifität zu beobachten.



### 5.7.1 Enzymatische Hydrolyse von PHB-Nanopartikeln

Aus den oben beschriebenen Untersuchungen bezüglich der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit von Polyestern, kann geschlussfolgert werden, dass die Abbaugeschwindigkeit durch die Mobilität der Polymerketten bestimmt wird. Bei teilkristallinen Polyestern lässt sich diese Mobilität durch die Differenz aus Polyesterschmelzpunkt und Messtemperatur und bei amorphen Polyestern durch die Differenz aus Mess- und Glastemperatur beschreiben.

So ist z.B. eine Spaltung der Esterbindungen teilkristalliner Filme des natürlichen Polyesters PHB (Poly- $\beta$ -hydroxybutyrat) durch die verwendeten Lipasen aus *Pseudomonas species* und aus *Candida cylindracea* bei 40°C, aufgrund der geringen Mobilität der Polymerketten (große Differenz von Polyesterschmelztemperatur ( $T_m=175^\circ\text{C}$ ) und Messtemperatur) nicht zu erwarten. Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigen Lipasen auch keine Aktivität gegenüber PHB, das nur von speziellen Enzymen, sogenannten PHB-Depolymerasen hydrolysiert wird [BATISTA et al. 1999].

Da sowohl die nativen als auch synthetisch erzeugte Nanopartikel des PHB amorph sind, [HOROWITZ et al. 1999] und die Mobilität der Polymerketten aufgrund der großen Differenz aus Mess- (z.B.  $T_{\text{Mess}}=40^\circ\text{C}$ ) und Glastemperatur ( $T_g=4^\circ\text{C}$ ) relativ groß ist, sollten die Esterbindungen der amorphen PHB-Nanopartikel von Lipasen gespalten werden können. Tatsächlich konnte eine Spaltung der Esterbindungen der PHB-Nanopartikel sowohl mittels der Lipase aus *Pseudomonas species* als auch mittels der Lipase aus *Candida cylindracea* nachgewiesen werden (s. **Abb. 8-22** im Anhang). Die Temperaturabhängigkeiten der Abbaugeschwindigkeiten entsprechen der für andere Polyester ermittelten Abhängigkeit der Abbauraten von der Differenz aus Mess- und Glastemperatur (s. Abb. 5-39 (Lipase aus *Pseudomonas species*) und Abb. 5-40 (Lipase aus *Candida cylindracea*)).

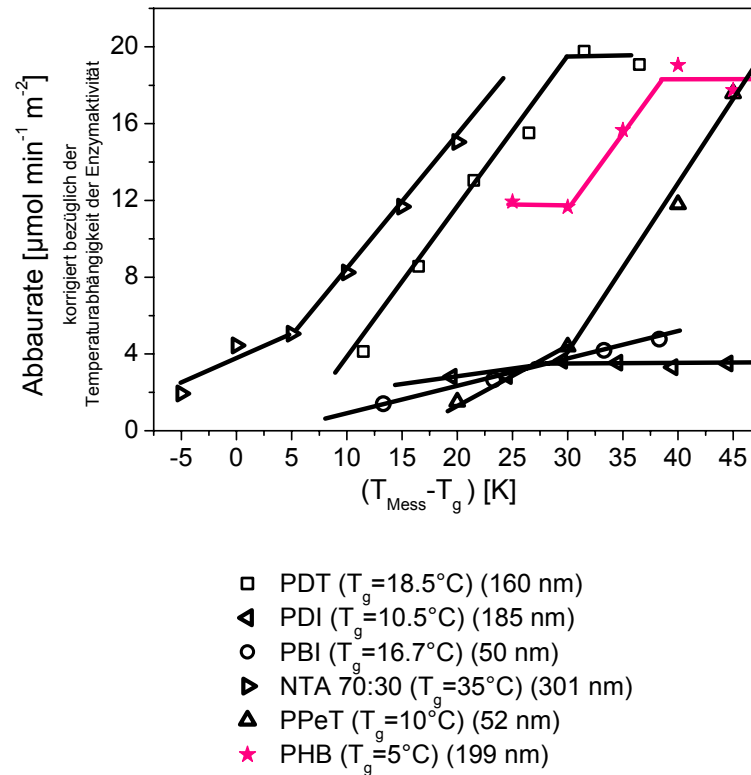


Abb. 5-39: Bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität korrigierte enzymatische Abbauraten (Lipase aus *Pseudomonas species*) von PHB-Nanopartikeln ( $\varnothing = 199$  nm) im Vergleich mit Nanopartikeln aromatischer Homopolyester und aliphatisch-aromatischer Copolyester in Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz zwischen Glasktemperatur ( $T_g$ ) und Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}}$ ). (Zur Berechnung der korrigierten Abbauraten s. Kapitel 4.9).

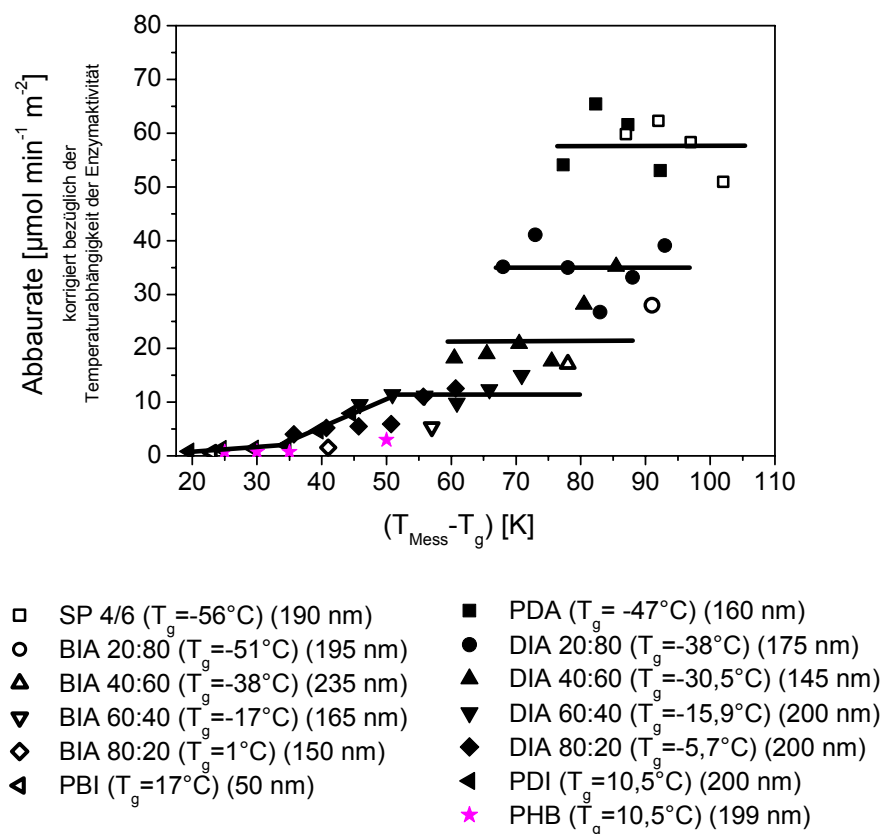


Abb. 5-40: Bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität korrigierte enzymatische Abbauraten (Lipase aus *Candida cylindracea*) von PHB-Nanopartikeln (Ø=199 nm) im Vergleich mit Nanopartikeln aliphatischer Homopolyester und aliphatisch-aromatischer Copolyester in Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz zwischen Glastemperatur (T<sub>g</sub>) und Messtemperatur (T<sub>Mess</sub>) (Zur Berechnung der korrigierten Abbauraten s. Kapitel 4.9).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Esterbindungen des PHB prinzipiell durch Lipasen spaltbar sind, wenn sie nicht in ein Kristall eingebunden sind. Die Abbaugeschwindigkeit wird dann, wie bei anderen amorphen Polyestern, durch die Mobilität der Polyesterketten (Differenz aus Mess- und Glastemperatur) kontrolliert.

### 5.7.2 Enzymatische Hydrolyse von PBT- und PET-Nanopartikeln

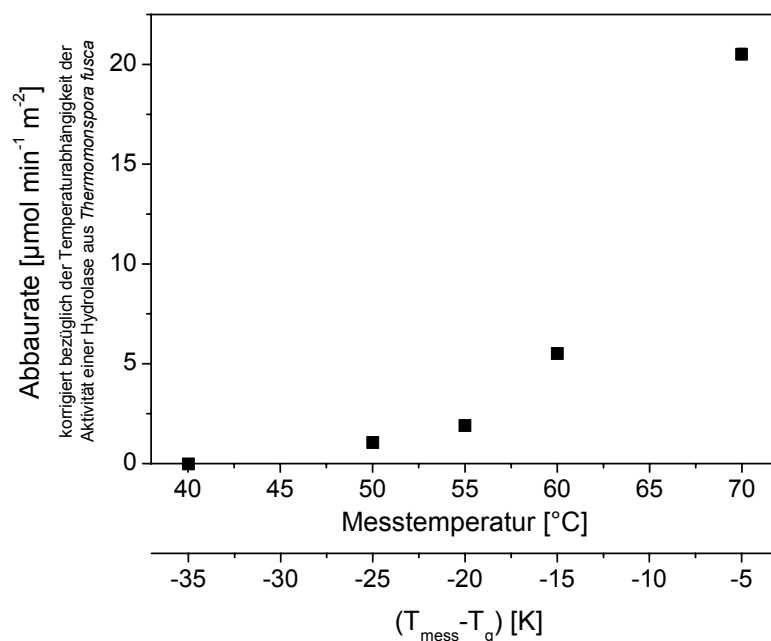
Es stellt sich jetzt allerdings die Frage, warum bei den Nanopartikeln des aromatischen Homopolyesters aus 1,4-Butandiol und Terephthalsäure (PBT) mit einer Glastemperatur von T<sub>g</sub>=45°C selbst bei höheren Messtemperaturen (T<sub>Mess</sub>=50°C) keine Esterspaltung nachgewiesen werden kann.

Die PBT-Nanopartikel sind aufgrund der hohen Kristallisationsgeschwindigkeit des PBT [PARK et al. 2000, OU et al. 2000] wahrscheinlich kristallin, sodass die enzymatische Spaltung der Esterbindungen durch die große Differenz aus Schmelzpunkt des Polyesters ( $T_m = 227^\circ\text{C}$ ) und der Messtemperatur (geringe Kettenmobilität) gehindert ist.

Im Gegensatz zum PBT weist der aromatische Homopolyester aus 1,2-Ethandiol und Terephthalsäure (PET) eine deutlich geringere Kristallisationsgeschwindigkeit auf [CONNOR et al. 2001, CHISHOLM und ZIMMER 2000], sodass die Nanopartikel dieses Polyesters im amorphen Zustand handhabbar sein sollten. Es konnte tatsächlich bei den PET-Nanopartikeln eine Esterspaltung mittels einer thermophilen Hydrolase aus *Thermomonospora fusca* bei einer Messtemperatur von  $50^\circ\text{C}$  nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist zunächst nicht zu erwarten, da die Glasstemperatur der trockenen Filme des PET oberhalb der Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}} = 50^\circ\text{C}$ ) bei  $T_g = 75^\circ\text{C}$  liegt. Wie bereits diskutiert, ist die Glasstemperatur abhängig von dem Wassergehalt und von der Dimension des Polyesters. Eine exakte Angabe der tatsächlichen Glasstemperatur des Polyesters in den Nanopartikeln ist folglich nicht möglich. Anhand von DSC-Messungen an in 4 Wochen in destilliertem Wasser eingelegten PET-Filmen, konnte gezeigt werden, dass die Glasstemperatur effektiv um ca.  $50^\circ\text{C}$  abnimmt (Glasstemperatur „wässriger“ PET-Filme  $T_g = 26^\circ\text{C}$ .) Somit beträgt die Differenz aus Mess- und Glasstemperatur  $T_{\text{Mess}} - T_g = 24^\circ\text{C}$ , was einer für die enzymatische Hydrolyse ausreichender Kettenmobilität entspricht. Wie temperaturabhängige Messungen zeigen, wird ebenfalls eine Zunahme der Abbaurate mit zunehmender Differenz zwischen Mess- und Glasstemperatur beim Abbau von PET-Nanopartikeln beobachtet (s. Abb. 5-41).

Abb. 5-41:

Abhängigkeit der  
Abbauraten (s. Kapitel 4.9)  
der PET-Nanopartikel  
( $\varnothing = 80\text{ nm}$ ) mittels einer  
Hydrolase aus  
*Thermomonospora fusca*  
von der Messtemperatur  
und der Differenz  
zwischen Mess- und  
Glasstemperatur  
(Glasstemperatur der  
„trockenen“ Filme).



---

Die Ergebnisse zum Abbau der Nanopartikel aromatischer Homopolyester zeigen, dass die Abbaurate amorpher Polyester hauptsächlich durch die Mobilität der Polymerketten beeinflusst wird. Prinzipiell sind demnach alle Polyesterbindungen durch Lipasen spaltbar, wenn sie eine „Mindestmobilität“ besitzen.



## 6 Zusammenfassende Diskussion

Erste Untersuchungen zur Beschleunigung der enzymatischen Hydrolyse von Polyestern durch Einsatz von Nanopartikeln wurden von WU und GAN (1998) publiziert. Sie verglichen die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit von Poly( $\epsilon$ -caprolacton)-Nanopartikeln ( $\varnothing \approx 100$  nm) und Poly( $\epsilon$ -caprolacton)-Filmen ( $A = 100 \text{ mm}^2$ ) durch eine nicht näher definierte *Pseudomonas*-Lipase mittels Lichtstremessungen und kamen zu dem Schluss, dass der enzymatische Abbau durch die Verwendung von Polyester-Nanopartikeln im Vergleich zu Filmen deutlich (Faktor  $10^3$ ) gesteigert werden kann. Allerdings lassen die Ergebnisse keine quantitative Bewertung der Abbaugeschwindigkeiten bezüglich des Einflusses der Partikelgröße (es wurde nur eine Größe untersucht) und bezüglich des Einflusses der Oberfläche auf die Abbaugeschwindigkeit zu. Da durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration eine Steigerung der Abbaugeschwindigkeit erzielt wurde, kann geschlussfolgert werden, dass die Arbeiten im Enzymunterschuss durchgeführt wurden und deshalb nicht die gesamte verfügbare Oberfläche für den Abbau genutzt wurde. Folglich sollte die tatsächliche erreichbare Abbaugeschwindigkeit der Nanopartikel noch größer als die von WU und GAN (1998) gemessene sein. Auch aus nachfolgenden Publikationen ist aus dem oben genannten Grund ein quantitativer Vergleich der auf die Oberfläche bezogenen Abbaugeschwindigkeiten der Nanopartikel und der Filme nicht möglich [GAN et al. 1999 a), GAN et al. 1999 b), ZHAO et al. 1999].

Um systematische Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Partikeldurchmesser und der Oberfläche auf die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit durchzuführen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Nanopartikeln mit verschiedenen und bekannten Durchmessern im Enzymüberschuss hydrolysiert. Da oberflächenstabilisierende Hilfsmittel („surfactants“) das Abbauverhalten der Nanopartikel beeinflussen [GAN et al. 1999 b)], wurden die Nanopartikel anders als bei WU und GAN (1998) ohne diese Stabilisatoren hergestellt. Als Testsystem wurde ein Titrationsverfahren angewandt, da hier im Gegensatz zu Lichtstremessungen die Spaltung der Esterbindung erfasst werden kann und nicht nur ein Masseverlust (gemessen über die Abnahme der Partikelradien) detektiert wird. Analog zu den Ergebnissen von WU und GAN (1998) wurde die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit von SP 4/6-Nanopartikeln ( $\varnothing = 200$  nm) im Vergleich zu SP 4/6-Filmen ( $A = 1,27 \text{ cm}^2$ ) signifikant gesteigert (Faktor  $10^3$ ). Darüber hinaus wurde eine Zunahme der Abbaugeschwindigkeit mit abnehmendem Partikeldurchmesser beobachtet. Diese Beobachtung steht zunächst im Widerspruch zu Literaturdaten bezüglich der rein chemischen Hydrolyse von Partikeln aus Polymilchsäure (PLA), wobei die Hydrolysegeschwindigkeit mit abnehmendem Partikeldurchmesser abnimmt [DUNNE et al. 2000, GRIZZI et al. 1995]. Erklärt werden kann diese Beobachtung dahingehend, dass im Gegensatz zur enzymatischen Hydrolyse, die

einen reinen Oberflächenprozess darstellt, die chemische Hydrolyse auch im Innern der Partikel stattfinden kann. In kleineren PLA-Partikeln ( $\varnothing=1\text{ }\mu\text{m}$ ) können die während der chemischen Hydrolyse gebildeten Abbauprodukte (Säuren) leicht an die Oberfläche diffundieren und somit aus dem Partikel verschwinden, während in größeren Partikeln ( $\varnothing=46\text{ }\mu\text{m}$ ) diese Produkte einen längeren Weg zur Oberfläche und damit eine größere Verweilzeit in dem Partikel aufweisen, währenddessen sie die Hydrolyse des restlichen Polymermaterials in einer autokatalytischen Reaktion beschleunigen.

Die beim enzymatischen Abbau von Nanopartikeln und Filmen aliphatischer Polyester beobachtete Beschleunigung der Abbaugeschwindigkeit ist, wider Erwarten, nicht proportional zu der Vergrößerung der Oberfläche, sondern teilweise um Faktoren größer, als durch die Vergrößerung der Oberfläche zu erwarten gewesen wäre.

Folglich kontrollieren neben der verfügbaren Oberfläche noch andere Faktoren die Abbaugeschwindigkeit von Polyestern. Wie aus der Literatur bekannt ist, wird die Abbaugeschwindigkeit von der Kristallinität des Polymeren beeinflusst, wobei die Abbaugeschwindigkeit mit abnehmender Kristallinität eines Kunststoffes zunimmt [SERETOUDI et al. 2002, MONTAUDO und RIZARELLI 2000, ABE et al. 1999, CANETTI et al. 1999, YOO und IM 1999, MOCHIZUKI et al. 1995, NISHIDA und TOKIWA 1993, HUANG 1985], und amorphe Bereiche werden schneller enzymatisch hydrolysiert als kristalline Domänen [ELDSÄTER et al. 2000, GAN et al. 1997, MOCHIZUKI et al. 1995, PARIKH et al. 1992, FIELDS et al. 1976].

Die beobachtete überproportionale Abbaugeschwindigkeit der Nanopartikel im Vergleich zu den Filmen kann demzufolge anhand einer Änderung der kristallinen Struktur in den Nanopartikeln erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel aliphatischer Homopolyester im Gegensatz zu den teilkristallinen Filmen vollständig amorph sind. In der Literatur ist beschrieben, dass Nanopartikel der Polyhydroxybuttersäure (PHB), einem natürlichen bakteriellen Polyester, eine andere kristalline Struktur aufweisen als PHB-Filme [DE KONING und LEMSTRA 1992]. So sind sowohl native als auch im Labor hergestellte PHB-Nanopartikel amorph [HOROWITZ und SANDERS 1994] und selbst bei Temperaturen, bei denen Filme kristallisieren würden, tritt keine Kristallisation in den Partikeln ein [HOROWITZ et al. 1999]. Weiterhin ist bekannt, dass sich die molekulare Organisation in ultradünnen Filmen (Filmdicke  $<100\text{ nm}$ ) und in dünnen Filmen (Filmdicke zwischen  $100\text{ nm}$  und  $1000\text{ nm}$ ) stark von der in Proben mit größeren Ausdehnungen unterscheidet [LOO et al. 2000, FRANK et al. 1996, DESPOTOPOULOU et al. 1996].

Die Änderung in der kristallinen Struktur beim Übergang zu Dimensionen von Nanopartikeln wurde auch bei anderen Polyestern beobachtet. So sind Nanopartikel einiger der hier untersuchten aromatischen Homopolyester wie die Nanopartikel der aliphatischen



Homopolyester amorph, bilden aber mit zunehmender Lagerdauer kleine Kristalle aus. Im Gegensatz dazu sind die Nanopartikel aliphatisch-aromatischer Copolyester von Beginn an teilkristallin, wobei die Größe der Kristallite jedoch in der Größenordnung der Nanopartikel liegen. Die kristalline Struktur der Nanopartikel ist folglich nicht bei allen Polyestern gleich, sondern abhängig von der Art des Polyesters.

Unter diesen Voraussetzungen (Änderungen in der kristallinen Struktur von Polymermaterialien bei der Herstellung von Nanopartikeln) ist die Anwendung von Nanopartikeln im Rahmen von optimierten Schnelltests, z.B. für den Einsatz als Standardtestverfahren zur Prüfung der Abbaubarkeit von Kunststoffen in realen Umgebungen kritisch zu bewerten. Nur unter der Voraussetzung, dass genaue Informationen bezüglich der kristallinen Struktur der Nanopartikel vorliegen, können die aus dem hier vorgestellten Test erhaltenen Abbaugeschwindigkeiten eventuell auf reale Systeme übertragen werden. Trotz dieser Einschränkung kann der beschleunigte Polymerabbau an Nanopartikeln genutzt werden, um schnell und reproduzierbar Abbauprodukte und -intermediate zu generieren, anschließend zu isolieren und zu charakterisieren und um somit Rückschlüsse auf den Abbaumechanismus zu erhalten [WITT et al. 2001].

Weiterhin zeigte sich im Verlauf der hier vorgestellten Untersuchungen, dass sich speziell aus den Besonderheiten des enzymatischen Abbaus von Nanopartikeln wertvolle Aussagen zu Fragen des Abbaumechanismus und der den Abbau kontrollierenden Parameter gewinnen lassen. Die kurzen Analysenzeiten des optimierten Testverfahrens ermöglichen zudem die systematische Untersuchung einer großen Anzahl von Proben mit hoher Reproduzierbarkeit.

Die Kristallinität hat aufgrund der unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten amorpher und kristalliner Domänen, einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtabbaugeschwindigkeit von Polyestern. In der Literatur wurde bislang nur beschrieben, dass der Abbau der amorphen Bereiche innerhalb eines Polyesterfilmes schneller verläuft als der der kristallinen Domänen. Ein qualitativer Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten fehlt jedoch, da eine direkte getrennte Bestimmung der beiden Abbaugeschwindigkeiten bislang nicht möglich war, sondern nur die Visualisierung einer Anreicherung kristalliner Domänen auf der Polyester-Oberfläche mittels REM-Aufnahmen erfolgte [ELDSÄTER et al. 2000] oder die Abnahme der Gesamtabbaugeschwindigkeit bei zunehmendem kristallinen Anteil in einem Material festgestellt wurde [TSUJI und MIJAUCHI 2001]. Aufgrund der besonderen Situation bezüglich der Größe der Kristallite innerhalb der Nanopartikel der hier untersuchten aliphatisch-aromatischen Copolyester ist, anders als bei z.B. Filmen, der gesamte amorphe Bereich des Materials dem abbauenden Enzym vollständig zugänglich. So war es nun erstmals möglich eine getrennte Bestimmung und damit einen quantitativen Vergleich der amorphen und kristallinen Abbaugeschwindigkeiten durchzuführen. Es zeigte sich, dass der

Abbau der amorphen Bereiche der Copolyester ca. 30-60fach schneller verläuft als der der kristallinen Domänen. Ein Vergleich der Abbaugeschwindigkeit der amorphen Struktur mit der Gesamtabbaugeschwindigkeit des teilkristallinen Materials ist weiterhin bei aliphatischen Homopolyester-Nanopartikeln möglich. Hier ist die amorphe Abbaugeschwindigkeit 1-370fach schneller als die Hydrolyserate des teilkristallinen Polymers, wobei diese Faktoren abhängig von der Differenz aus Polyesterschmelzpunkt und Messtemperatur ( $T_m - T_{\text{Mess}} = \Delta T_{\text{ma}}$ ) sind.

MARTEN (2000) führt die zunehmende enzymatisch katalysierte Hydrolyserate von Polyestern bei Annäherung der Abbautemperatur an deren Schmelzpunkt (abnehmendes  $\Delta T_{\text{ma}}$ ) auf die damit verbundene Erhöhung der Mobilität der Ketten in den kristallinen Bereichen zurück.

Die Polymerketten müssen über eine Mindestmobilität verfügen, damit ein Eindringen der Polyesterketten in den katalytischen Spalt des Enzyms und die für die Spaltung notwendige Positionierung am aktiven Zentrum der Lipase möglich wird. Diese Mobilität der Polymerketten korreliert mit der Differenz aus Polyesterschmelz- und Messtemperatur ( $\Delta T_{\text{ma}}$ ). Bei Annäherung an die Polyesterschmelztemperatur nehmen die Bewegungen der Polymerketten zu, bis sie am Schmelzpunkt ausreichen, um die innerhalb der Kristallite wirksamen Wechselwirkungen zu überwinden und aus dem Kristallverbund herauszutreten und um in das aktive Zentrum der Lipase einzudringen.

Durch die hier vorgestellten Ergebnisse konnte eindeutig bestätigt werden, dass vor allem der Abbau der geordneten, kristallinen Domänen stark temperaturabhängig ist, während der Abbau des amorphen Anteils nur Aktivierungsenergien aufweist, wie sie auch bei der enzymatischen Hydrolyse niedermolekularer Substrate beobachtet wird.

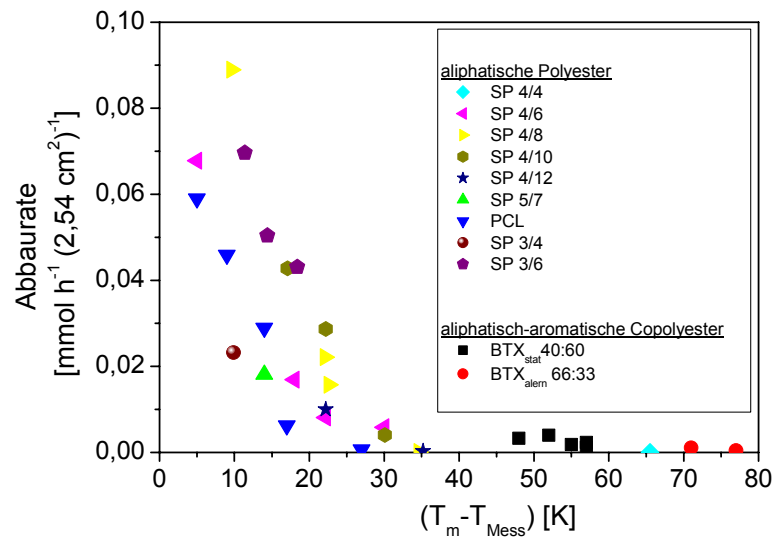
Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass unter bestimmten Voraussetzungen auch die Abbaugeschwindigkeit amorpher Polyester durch die Mobilität der Polymerketten determiniert wird, wobei auch hier ein Anstieg der Abbaugeschwindigkeit mit zunehmender Kettenmobilität gefunden wird. Analog zu den teilkristallinen Polyestern, bei denen die Mobilität durch die Differenz aus Schmelz- und Messtemperatur ( $\Delta T_{\text{ma}}$ ) beschrieben werden kann, korreliert die Mobilität der amorphen Polymerketten mit der Differenz aus Mess- und Glasstemperatur ( $T_{\text{Mess}} - T_g = \Delta T_{\text{ag}}$ ), da bei der Glasstemperatur die Rotationsbewegungen der Monomersegmente in der Kette eingefroren werden [TIEKE 1997]. Besitzen die Ketten bei ausreichend großen  $\Delta T_{\text{ag}}$  allerdings eine gewisse „Mindestmobilität“, tritt der Einfluss der Mobilität in den Hintergrund und substratspezifische Faktoren bestimmen dann die Abbaucharakteristik der entsprechenden Polymere. Diese substratspezifischen Faktoren sind normalerweise bei teilkristallinen Polymeren von kristallinen Effekten überlagert und aufgrund ihrer geringen Auswirkungen nicht erfassbar.

Schlussfolgerung der hier vorgestellten Untersuchungen ist, dass jede Esterbindung eines Polyesters (und u.U. andere hydrolysierbare Polymere wie z.B. Polyamiden) prinzipiell von Lipasen (bzw. anderen geeigneten Hydrolasen) spaltbar ist, wenn die Polymerkette nur über die notwendige Mobilität verfügt, sodass sie bis zum aktiven Zentrum der Lipase vordringen kann, um dort gespalten zu werden. So konnte gezeigt werden, dass sogar Esterbindungen von rein aromatischen Homopolyestern, die bislang als inert gegenüber dem enzymatischen Angriff galten, von Lipasen gespalten werden können, wenn die Ketten eine ausreichende Mobilität aufweisen, wie es z.B. in amorphen Nanopartikeln von PET der Fall ist. Bei PET-Filmen konnte aufgrund der hohen Schmelzpunkte ( $>200^{\circ}\text{C}$ ) und der damit verbundenen geringen Mobilität der Polymerketten, keine Esterspaltung nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der enzymatischen Hydrolyse von Polyhydroxybuttersäure erzielt. Während PHB-Filme aufgrund des hohen Schmelzpunktes von  $\text{ca.}180^{\circ}\text{C}$  und der damit verbundenen geringen Kettenmobilität nicht von Lipasen angegriffen wurden, sind die Esterbindungen in amorphen PHB-Nanopartikeln aufgrund der höheren Mobilität der Ketten durchaus von Lipasen spaltbar.

Folglich spielt auch bei amorphen Polyestern die Mobilität der Ketten eine signifikante Rolle beim enzymatischen Abbau. Offen bleibt allerdings die Frage, warum die Abbaugeschwindigkeit vollständig amorpher vernetzter Strukturen mit einer Glastemperatur (z.B. vernetztes SP 3/4,  $T_g = -24,4^{\circ}\text{C}$ ) deutlich unterhalb der Messtemperatur ( $T_{\text{Mess}} = 40^{\circ}\text{C}$ ), wesentlich geringer ist als die der unvernetzten Prepolyester mit einer ähnlichen Glastemperatur (SP 3/4,  $T_g = -31^{\circ}\text{C}$ ) [WELZEL 1999, BAHARI et al. 1998, NAGATA et al. 1998 b, NAGATA et al. 1997 a, NAGATA et al. 1997 b, NAGATA et al. 1996, HUANG 1985]. Eine mögliche Erklärung ist die Hinderung des Eindringens der Ketten in den trogförmigen Zugangsbereiches zum aktiven Zentrum der Lipase aufgrund der reduzierten Mobilität der Polymerpunkte aufgrund der Einbindung der Ketten in das dreidimensionale Netzwerk.

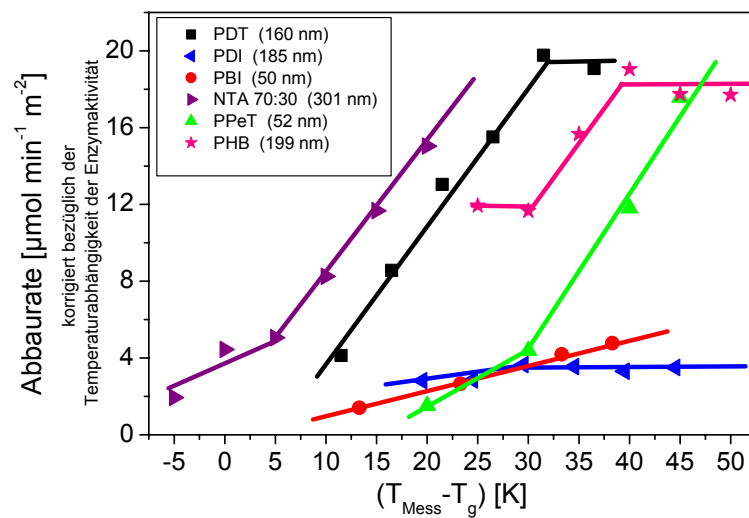
Ein Vergleich der Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von der Mobilität (Temperaturdifferenz zu  $T_g$  bzw.  $T_m$ ) für den Fall teilkristalliner und amorpher Polymerketten ist in Abb. 6-1 dargestellt.

## a) Filme



←  
Zunahme der Kettenmobilität

## b) Nanopartikel



→  
Zunahme der Kettenmobilität

Abb. 6-1: Abhängigkeit der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit (Lipase aus *Pseudomonas species*) von der Mobilität a) teilkristalliner Polymerketten in Filmen [MARTEN 2000] und b) amorpher Polymerketten in Nanopartikeln. Die Mobilität der teilkristallinen Polymerketten kann durch die Differenz aus Schmelz- und Messtemperatur und die der amorphen Polymerketten durch die Differenz aus Mess- und Glastemperatur ausgedrückt werden.

Die Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit amorpher Polymerketten von der Mobilität ist nicht so eindeutig wie die Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit teilkristalliner Polymerketten. Dies liegt darin begründet, dass die Glastemperatur wesentlich unschärfer und abhängiger von Umgebungsbedingungen ist als die Schmelztemperatur. Es handelt sich nicht, wie beim Kristallisieren, um ein sprunghaftes „Einrasten“ der Moleküle zu einer Anordnung minimaler potentieller Energie, sondern vielmehr um ein allmähliches Einfrieren der Molekularbewegungen [VOLLMERT 1988]. In der Literatur ist beispielsweise beschrieben, dass sich die Glastemperatur wässriger Systeme von denen trockener Substanzen signifikant unterscheiden kann [SCATENA et al. 1968, LEE et al. 1997], und darüber hinaus wird die Glastemperatur von der Dimension des Polyesters beeinflusst. So beobachteten WANG und ZHOU (2002) und KIM et al. (2000) eine Abnahme der Glastemperatur bei ultradünnen Filmen im Vergleich zu größeren Ausdehnungen.

Die gemachten Aussagen bezüglich der Kontrolle der biologischen Abbaubarkeit von Polyestern durch die Kettenmobilität muss vor dem Hintergrund der speziellen Proteinstruktur der Lipasen gesehen werden. Im Gegensatz zu Lipasen, die eine bestimmte Mobilität der Polymerketten als Voraussetzung für eine Spaltung der Esterbindungen benötigen (da das aktive Zentrum im Proteinkörper der Lipase verborgen liegt), spalten z.B. sogenannte PHB-Depolymerasen auch kristalline Polyester, speziell Polyhydroxybuttersäure. Diese PHB-Depolymerasen spalten sogar PHB-Einkristalle, wobei allerdings auch hier bevorzugt Ketten gespalten werden, die eine höhere Mobilität aufweisen [KIKKAWA et al. 2002 a), KIKKAWA et al. 2002 b), IWATA et al. 2002, MURASE et al. 2001, IWATA et al. 2001, ABE et al. 2000, GAN et al. 2000, ABE und DOI 1999, IWATA und DOI 1999, IWATA et al. 1999, IWATA und DOI 1998, IWATA et al. 1997]. So startet der enzymatische Abbau von PHB und SP 2/4-Einkristallen an den Kanten des Kristalls, wo laut ABE et al. (2000) die Mobilität der Polymerketten am Größten ist (die Kristalle sehen nach dem enzymatischen Abbau wie eine Art Kamm aus (s. Abb. 6-2)).

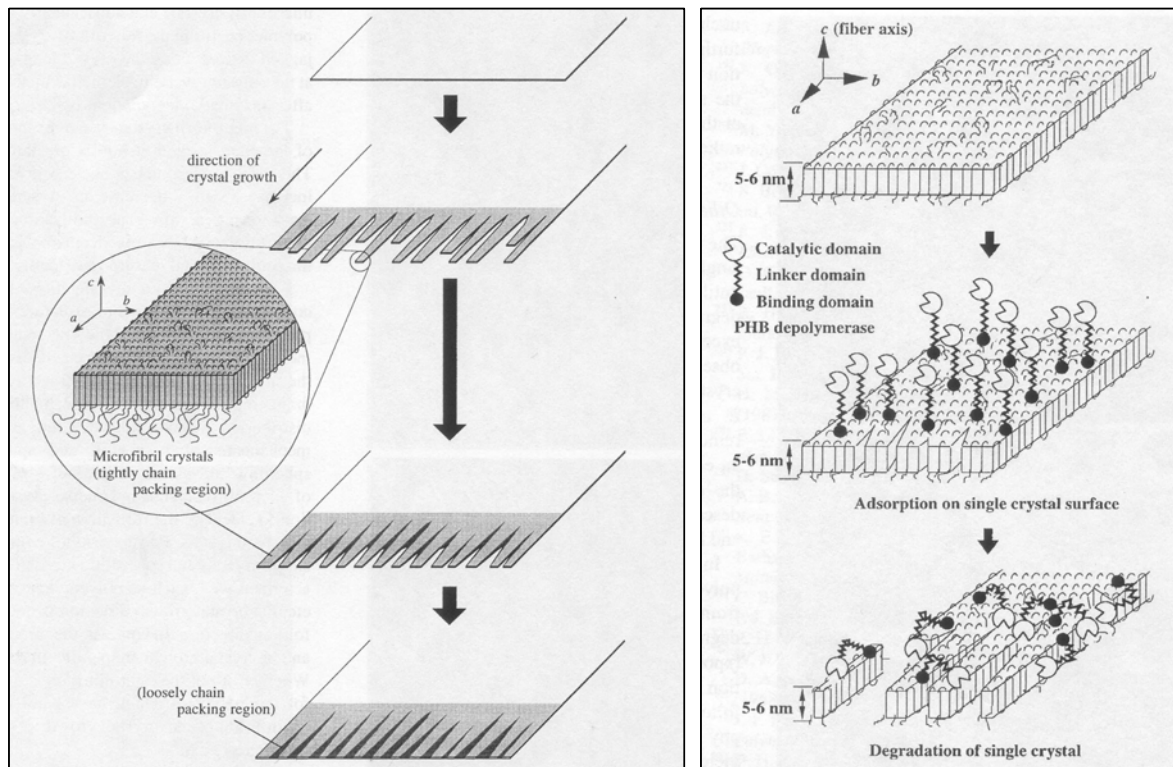


Abb. 6-2: Schema der Kristallinität von PHB-Einkristallen [ABE et al. 2000] und der Struktur von PHB-Einkristallen während des enzymatischen Abbaus mit einer PHB-Depolymerase [IWATA und DOI 1999].

Im folgenden Schema sind die unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die enzymatischen Abbaugeschwindigkeiten von teilkristallinen und amorphen Polyestern durch Lipasen zusammengefasst (s. Abb. 6-3).

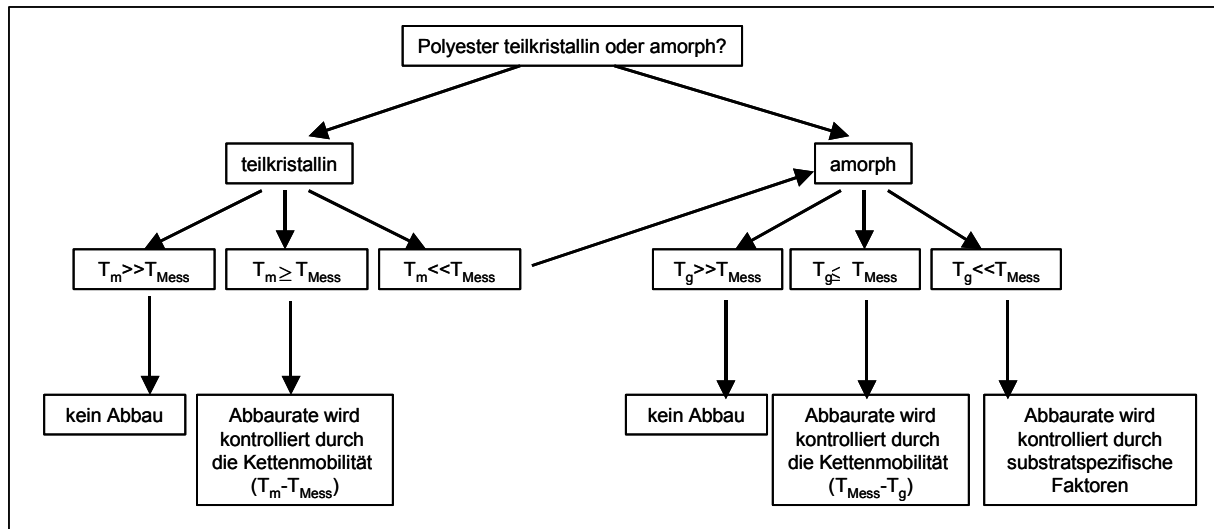


Abb. 6-3: Faktoren, die die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit von Polyestern kontrollieren.

Bei teilkristallinen Polymeren wird die Abbaugeschwindigkeit durch die Kettenmobilität, der Differenz zwischen Schmelz- und Messtemperatur ( $\Delta T_{ma}$ ), kontrolliert. Eine oft postulierte Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit z.B. von der  $\text{CH}_2$ -Kettenlänge (Hydrophilie, Hydrophobie) [CAI et al. 1998, KIM und KIM 1998] wird üblicherweise durch den Einfluss der Abbaugeschwindigkeit der Kristalle ( $\Delta T_{ma}$ ) überdeckt und spielt nur bei einem Abbau in der Nähe des Schmelzpunktes eine Rolle.

Grundsätzlich ist das Prinzip der Kettenmobilität auch auf den amorphen Bereich der Polymere anwendbar. Hier wird die Kettenmobilität durch die Differenz zwischen Glas- und Messtemperatur ( $\Delta T_{mg}$ ) bestimmt. Der Einfluss der Kettenmobilität auf die Abbaugeschwindigkeit amorpher Polymere ist aber von geringerer Bedeutung als bei teilkristallinen Polymeren, da er weniger stark ausgeprägt ist. Weiterhin liegt bei den meisten aliphatischen Polyestern die Glasstemperatur sehr weit unterhalb der Messtemperatur und verliert somit vollständig an Bedeutung. Hier treten dann nicht näher identifizierte substratspezifische Einflussfaktoren in den Vordergrund.





## 7 Literatur

- Abe H., Matsubara I., Doi Y.; „Physical Properties and Enzymatic Degradability of Polymer Blends of Bacterial Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] Stereoisomers“ *Macromolecules* 28, 844 (1995)
- Abe H., Doi Y.; „Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolyesters“ *International Journal of Biological Macromolecules* 25, 185-192 (1999)
- Abe H., Kikkawa Y., Iwata T., Aoki H., Akehata T., Doi Y.; „Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers“ *Polymer* 41, 867-874 (2000)
- Aminabhavi, T.M., Balundgi R.H., Cassidy P.E.; „A review on biodegradable plastics“ *Polym.-Plast. Technol. Eng.* 29(3), 235-262 (1990)
- Anderson J.M., Shive M.S.; „Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres“ *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 5-24 (1997)
- Arenskötter M., Baumeister D., Bröker D., Ebaid I., Rose K., Steinbüchel A.; „Mikrobieller Abbau von Natur- und Synthesekautschuk“ *BIOforum* 3, 124-126 (2002)
- Augusta, J., Müller R.-J., Widdecke H.; „Biologisch abbaubare Kunststoffe: Testverfahren und Beurteilungskriterien“ *Chemie-Ingenieur-Technik* 64 (5), 410-415 (1992)
- Bahari, K., Mitomo H., Enjoji T., Yoshii F., Makuuchi K.; „Radiation crosslinked poly(butylene succinate) foam and its biodegradation“ *Polymer Degradation and Stability* 62, 551-557 (1998)
- Batista A., Aponte M., Diaz E., Reyes H.; „Comparision of the Catalytic Activity of PHB-Depolymerase, Yeast Lipase and Papain on Poly(ethylene adipate) , Poly(ethylene succinate) and Poly(3-hydroxybutyric acid)-co-(3-hydroxyvaleric acid)“ *Journal of Polymer Science A* 37, 2581-2585 (1999)
- Benzler B.; „Thermische Analysen, Teil I: Grundlagen und Definitionen“ *CLB Chemie für Labor und Betrieb*, 33 (1) (1982)
- Bornscheuer U., Reif O.W., Lausch R., Freitag R., Scheper T., Menge U.; „Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization“ *Biochim. Biophys. Acta.* 1201 (1), 55-60 (1994)
- Bouma K., Regelink M., Gaymans R. J.; „Crystallization of PET modified with codiols“ *Journal of Applied Polymer Science* 80, 2676-2682 (2001)

- Brandrup, Immergut, "Polymer Handbook", second edition, John Wiley and Sons, New York (1975)
- Brannon-Peppas L.; "Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery." International Journal of Pharmaceutics 116, 1-9 (1995)
- Cai J., Zhu J., Yang S.L.; „Surface biodegradable copolymers-poly(D,L-lactide-co-1-methyl-1,3-trimethylene carbonate) and poly(D,L-lactide-co-2,2-dimethyl-1,3-trimethylene carbonate): preparation, characterization and biodegradation characteristics in vivo“ Polymer 39 (18), 4409-4415 (1998)
- Canetti, M., Urso M., Sadocco P.; „Influence of the morphology and of the supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate)“ Polymer 40, 2587-2594 (1999)
- Chisholm B.J., Zimmer J.G.; „Isothermal Crystallization Kinetics of Commercially Important Polyalkylene Terephthalates“ GE Research & Development Center, Technical Information Series (2000)
- Connor D. M., Allen S. D., Collard D. M., Liotta C. L., Schiraldi D. A.; „Effect of linear comonomers on the rate of crystallization of copolyesters“ Journal of Applied Polymer Science 80, 2696-2704 (2001)
- Cowie J.M.G.; „Chemie und Physik der synthetischen Polymeren“ Vieweg Lehrbuch, Braunschweig (1997)
- Cygler M., Schrag J. D.; „Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase“ Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1441, 205-214 (1999)
- Darby R. T., Kaplan A. M.; „Ungal susceptibility of polyurethanes“ Applied Microbiology 16, 900-905 (1968)
- de Koning G. J. M., Lemstra P. J.; „The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] in vivo“ Polymer 33, 3292-3294 (1992)
- Despotopoulou M. M., Frank C. W., Miller R. D., Rabolt J. F.; „Kinetics of Chain Organization in Ultrathin Poly(di-n-hexylsilane) Films“ Macromolecules 29, 5797-5804 (1996)
- DIN 54900; „Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen“ Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH Berlin (1998)

- Dunne M., Corrigan O.I., Ramtoola Z.; „Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles“ *Biomaterials* 21, 1659-1668 (2000)
- Eldstäter C., Erlandsson B., Renstad R., Albertsson A.-C., Karlsson S.; „The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly( $\epsilon$ -caprolactone)“ *Polymer* 41, 1297-1304 (2000)
- Erlandsson B., Karlsson S., Albertsson A.-C.; „The mode of action of corn starch and a preoxidant system in LDPE: influence of thermooxidation and UV-irradiation on the molecular weight changes“ *Polymer Degradation and Stability* 55, 237-245 (1997)
- Fields R.D., Rodriguez F.; „Microbial degradation of aliphatic polyesters“ *Proceedings of the 3. Int. Biodegradation Symposium*; I.M. Sharpley, A.M. Kaplan (Herausgeber), Appl. Sci., Barking, England, 775, (1976)
- Finelli L., Lotti N., Munari A.; „Crystallization kinetics and melting behavior of poly(butylene isophthalate/terephthalate) random copolyesters“ *European Polymer Journal* 37, 2039-2046 (2001 a)
- Finelli L., Lotti N., Fiorini M., Righetti M. C., Munari A.; „Melting behavior and crystallization kinetics of poly(butylene terephthalate-co-diethylene terephthalate) and poly(butylene terephthalate-co-triethylene terephthalate) copolyesters“ *Journal of Applied Polymer Science* 81, 3545-3551 (2001 b)
- Focarete M. L., Ceccorulli G., Scandola M., Kowalczyk M.; „Further evidence of crystallinity-induced biodegradation of synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate) by PHB-Depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei*. Blends of atactic poly(3-hydroxybutyrate) with crystalline polyesters“ *Macromolecules* 31, 8485-8492 (1998)
- Frank C. W., Rao V., Despotopoulou M. M., Pease R. F. W., Hinsberg W. D., Miller R. D., Rabolt J. F.; „Structure in Thin and Ultrathin Spin-Cast Polymer Films“ *Science* 273, 912-915 (1996)
- Gan Z., Liang Q., Zhang J., Jing X.; „Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases“ *Polymer Degradation and Stability* 56, 209-213 (1997)
- Gan Z., Fung J.T., Jing X., Wu C., Kulicke W.-K.; „A novel laser light-scattering study of enzymatic biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolacton) nanoparticles“ *Polymer*, 40, 1961-1967 (1999 a)
- Gan Z., Jim T.J., Li M., Yuer Z., Wang S., Wu C.; „Enzymatic Biodegradation of Poly(ethylene oxide-b- $\epsilon$ -caprolactone) Diblock Copolymer and Its Potential Biomedical Applications“ *Macromolecules* 32 (2), 590-594 (1999 b)

- Gan Z., Abe H., Doi Y.; „Biodegradable Poly(ethylene succinate) (PES). 2. Crystal Morphology of Melt-Crystallized Ultrathin Film and Its Change after Enzymatic Degradation“ *Biomacromolecules* 1 (4), 713-720 (2000)
- Gan Z., Abe H., Kurokawa H., Doi Y.; „Solid-state Microstructure, Thermal Properties, and Crystallization of Biodegradable Poly(butylene succinate) (PBS) and its Copolyesters“ *Biomacromolecules* 2 (2), 605-613 (2001)
- Grizzi I., Garreau H., Li S., Vert M.; „Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence“ *Biomaterials* 16, 305-311 (1995)
- Gross R.A., Kalra B.; „Biodegradable Polymers for the Environment“ *Science*, 297, 803-807 (2002)
- Hässlin H.-W., Dröscher M., Wegner G.; „Struktur und Eigenschaften segmentierter Polyetherester, Synthese definierter Oligomerer des Polybutylenterephthalats“ *Makromol. Chem.* 181, 301-323 (1980)
- He Y., Shuai X., Cao A., Kasuya K., Doi Y., Inoue Y.; „Enzymatic biodegradation of synthetic atactic poly(R,S-3-hydroxybutyrate) enhanced by an amorphous nonbiodegradable polymer“ *Polymer Degradation and Stability* 73, 193-199 (2001 a)
- He Y., Shuai X., Cao A., Kasuya K., Doi Y., Inoue Y.; „Enzymatic Degradation of Atactic Poly(R,S-3-hydroxybutyrate) Induced by Amorphous Polymers and the Enzymatic Degradation Temperature Window of an Amorphous Polymer System“ *Biomacromolecules* 2 (3) 1045-1051 (2001 b)
- He Y., Shuai X., Cao A., Kasuya K., Doi Y., Inoue Y.; „Enzymatic degradation of chemosnthetic atatic P(3HB) enhanced by an amorphous non-biodegradable polymer: belnd od atactic P(3HB) with PMMA“ *Macromolel. Rapid Commun.* 21, 1277-1281 (2000)
- Heck B., Sadiku E. R., Strobl G. R.; „SAXS and DSC studies of the crystallization and melting phenomena of poly(-caprolactone)“ *Macromolecular symposia* 165, 99-113 (2001)
- Helistö P., Korpola T.; „Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method“ *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 113-117 (1998)
- Horowitz D.M., Sanders J.K.M.; „Amorphous, Biomimetic Granules of Polyhydroxybutyrate: Preparation, Characterization, and Biological Implications“ *Journal of the American Chemical Society* 116 (7), 2695-1702 (1994)
- Horowitz D.M., Brennan E.M., Koon J.J., Gerngross T.U.; „Novel Thermal Route to an Amorphous, Film-Forming Polymer Latex“ *Macromolecules* 32, 3347-3352 (1999)

- Huang, S.J.; „Biodegradable polymers“ *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* 2, 220-241 (1985)
- Huang, S.J.; „Biodegradation“ *Comprehensive Polymer Science* 6, 597-606 (1989)
- Hyun J.; „A new approach to characterize crystallinity by observing the mobility of plasma treated polymer surfaces“ *Polymer* 42, 6473-6477 (2001)
- Iwata T., Doi, Y., Tanaka T., Akehata T., Shiromo M., Teramachi S.; „Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerase from *Comamonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1“ *Macromolecules* 30, 5290-5296 (1997)
- Iwata T., Doi Y.; „Morphology and Enzymatic Degradation of Poly(L-lactic acid) Single Crystals“ *Macromolecules* 31, 2461-2467 (1998)
- Iwata T., Doi Y., Nakayama S., Sasatsuki H., Teramachi S.; „Structure and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] copolymer single crystals with an extracellular PHB-Depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1“ *International Journal of Biological Macromolecules* 25, 169-176 (1999)
- Iwata T., Doi Y.; „Crystal structure and biodegradation of aliphatic polyester crystals“ *Macromolecular Chemistry and Physics* 200, 2429-2442 (1999)
- Iwata T., Doi Y., Isono K.; Yoshida Y.; „Morphology and Enzymatic Degradation of Solution-Grown Single Crystals of Poly(ethylene succinate)“ *Macromolecules* 34, 7343-7348 (2001)
- Iwata T., Shiromo M., Doi Y.; „Surface Structures of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Its Copolymer Single Crystals Before and After Enzymatic Degradation with an Extracellular PHB-Depolymerase“ *Macromolecular Chemistry and Physics* 203, 1309-1316 (2002)
- Ihara F., Kageyama Y., Hirata M., Nihira T., Yamada Y.; „Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas species*“ *J. Biol. Chem.* 266 (27), 18135-18140 (1991)
- Jäger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., van Heuvel M., Misset O.; „Bacterial lipases“ *FEMS Microbiology Reviews* 15, 29-63 (1994)
- Jendrossek, D.; „Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases“ *Polymer Degradation and Stability* 59, 317-325 (1998)
- Jopski, T.; „Biologisch abbaubare Kunststoffe“ *Kunststoffe* 83, 748-751 (1993)

- Kobayashi S., Uyama H., Takamoto T.; „Lipase-Catalyzed Degradation of Polyesters in Organic Solvents. A New Methodology of Polymer Recycling Using Enzyme as Catalyst“ *Biomacromolecules* 1, 3-5 (2000)
- Kaplan D.L., Mayer J.M., Ball D., McCassie J., Allen A.L., Stenhouse P.; „Fundamentals of Biodegradable Polymers“ In: Ching C., Kaplan D.L., Thomas E.L. (Herausgeber): *Biodegradable Polymers and Packaging*. Technomic Publishing AG, Basel (1994)
- Karayannidis G.P., Bikiaris D.N., Papageorgiou G.Z., Pastras S.V.; „Synthesis and Characterization of Poly(ethylene terephthalate-co-isophthalate)s with Low Content of Isophthalate Units“ *Journal of Applied Polymer Science* 86, 1931-1941 (2002)
- Kawai F.; „Breakdown of plastics and polymers by microorganisms“ *Advances in Biochemecical Engeneering* 52, 151-194 (1995)
- Kawai F., Watanabe M., Shibata M., Yokoyama S., Sudate Y.; „Experimental analysis ans numerical simulation for biodradability of polyethylene“ *Polymer Degradation and Stability* 76, 129-135 (2002)
- Khan M.A., Idriss Ali K.M., Yoshii F., Makuuchi K.; „Enzymatic degradation of Bionolle and Bionolle-rubber blends“ *Polymer Degradation and Stability* 63, 261-264 (1999)
- Ki H.C., Park O.O.; „Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyesters“ *Polymer* 42, 1849-1861 (2001)
- Kikkawa Y., Abe H., Iwata T., Inoue Y., Doi Y.; „Crystal morphologies and enzymatic degradation of melt-crystallized thin film of random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids“ *Polymer Degradation and Stability* 76, 467-478 (2002 a)
- Kikkawa Y., Murase T., Abe H., Iwata T., Inoue Y., Doi Y.; „Real-Time Enzymatic Degradation Study of Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] Copolymer Thin Film by Atomic Force Microscopy in Buffer Solution“ *Macromol. Biosci.* 2, 189-194 (2002 b)
- Kim Y.D., Kim S.C.; „Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions“ *Polymer Degradation and Stability* 62, 343-352 (1998)
- Kim J.H., Jang J., Zin W.-C.; „Estimation of the Thickness Dependence of the Glass Transition Temperature in Various Thin Polymer Films“ *Langmuir* 16, 4064-4067 (2000)
- Kleeberg I., Hetz C., Kroppenstedt R.M., Müller R.J., Deckwer W.-D.; „Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates“ *Appl. Environ. Polym. Degrad.* 64 (5), 1731-1735 (1998)

- Kleeberg I.; „Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen Copolyestern sowie Isolierung und Charakterisierung eines polyesterspaltenden Enzyms“ Dissertation der Technischen Universität Braunschweig (1999)
- Klein, S.; „Untersuchungen zum Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse von Polyestermaterialien mittels Lipase“ Diplomarbeit der Technischen Fachhochschule Berlin, Fachbereich Chemie- und Biotechnik (1996)
- Koch, R., Lund H.; WO 98/36086 (20.08.1998)
- Kojima Y., Yokoe M., Mase T.; „Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102“ Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 58 (9), 1564-1568 (1994)
- Kong Y., Hay J. N. N.; „The measurement of the crystallinity of polymers by DSC“ Polymer 43, 3873-3878 (2002)
- Kuwabara K., Gan Z., Nakamura T., Abe H., Doi Y.; „Crystalline/Amorphous Phase Structure and Molecular Mobility of Biodegradable Poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) and Related Polyesters“ Biomacromolecules 3, 390-396 (2002)
- Lee D.I., Walker L.C., Kann C.S.; „The Thermal Behaviors of Latexes: Wet Latex Glass Transition Temperatures“ Macromol. Symp. 118, 267-273 (1997)
- Lehninger A.L.; „Prinzipien der Biochemie“ Walter de Gruyter, Berlin (1987)
- Li B., Yu J., Lee S., Ree M.; „Poly(ethylene terephthalate co ethylene isophthalate)-relationship between physical properties and chemical structures“ European Polymer Journal 35 (9), 1607-1610 (1999 a)
- Li B., Yu J., Lee S., Ree M.; „Crystallizations of poly(ethylene terephthalate co ethylene isophthalate“ Polymer 40, 5371-5375 (1999 b)
- Li S., Tenon M., Garreau H., Braud C., Vert M.; „Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, DL- and meso-lactides“ Polymer degradation and stability 67, 85-90 (2000)
- Loo Y.-L., Register R. A.; Ryan A. J.; „Polymer crystallization in 24-nm spheres“ Physical review letter 84 (18), 4120-4123 (2000)
- Lotti N., Finelli L., Fiorini M., Righetti M.C., Munari A.; „Synthesis and characterization of poly(butylene terephthalate-co-diethylene terephthalate) copolyesters“ Polymer 41 (14), 5297-5304 (2000)

- Lotti N., Finelli L., Fiorini M., Righetti M. C., Munari A.; „Synthesis and characterization of poly(butylene terephthalate-co-triethylene terephthalate) copolyesters“ *Journal of Applied Polymer Science* 81, 981-990 (2001)
- Lotti N., Finelli L., Siracusa V., Munari A., Gazzano M.; „Synthesis and characterization of poly(butylene terephthalate-co-tiodiethylene terephthalate) copolyesters“ *Polymer* 43, 4355-4363 (2002)
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.; „Protein measurements with the folin phenol reagent.“ *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- Macrae A.R., Hammond R.C.; „Present and Future Applications of Lipases“ *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 3, 193-217 (1985)
- Marten E.; „Korrelation zwischen der Struktur und der enzymatischen Hydrolyse von Polyestern“ *Dissertation der Technischen Universität Braunschweig* (2000)
- Matsumura S., Tomizawa N., Toki A., Nishikawa K., Toshima K.; „Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism“ *Macromolecules* 32, 7753-7761 (1999)
- Mochizuki, M., Hiram M., Kanmuri Y., Kudo K., Tokiwa Y.; "Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effect of draw ratio on enzymatic degradation" *Journal of Applied Polymer Science* 55, 289-296 (1995)
- Mochizuki M., Hiram M.; „Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters“ *Polymers for Advanced Technologies* 8, 203-209 (1996)
- Mochizuki M., Mukai K., Yamada K., Ichise N., Murase S., Iwaya Y.; „Structural Effects upon Enzymatic Hydrolysis of Poly(butylene succinate-co-ethylene succinate)s“ *Macromolecules* 30, 7403-7407 (1997)
- Monataudo G., Rizzarelli P.; „Synthesis and enzymatic degradation of aliphatic copolyesters.“ *Polymer Degradation and Stability* 70 (2), 305-314 (2000)
- Mukai K., Yamada K., Doi Y.; „Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium.“ *Polymer Degradation and Stability* 41, 85-91 (1993 a)
- Mukai, K., Yamada K., Doi Y.; „Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly(R)-3-hydroxybutyrate film by PHA depolymerase“ *Int. J. Biol. Macromol.* 15, 361-366 (1993 b)



- Müller, R.-J., Augusta J., Walter T., Widdecke H.; „The development and modification of some special test methods and the progress in standardisation of test methods in germany“, in: Y. Doi, K. Fukuda (Herausgeber) „Biodegradable Plastics and Polymers“ Elsevier, New York, 237-249 (1994)
- Müller R.-J., Kleeberg I., Deckwer W.-D.; „Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents“ *Journal of Biotechnology* 86, 87-95 (2001)
- Müller R.-J.; „Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing“ In: *Biopolymers* Vol. 10, A. Steinbüchel (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, in press. (2002)
- Murase T., Iwata T., Doi Y.; „Atomic Force Microscopy Investigation of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Lamellar Single Crystals: Relationship between Molecular Weight and Enzymatic Degradation Behavior“ *Macromol. Biosci.* 1, 275-281 (2001)
- Nagata, M., Kiyotsukuri T., Ibuki H., Tsutsumi N., Sakai W.; „Synthesis and enzymatic degradation of regular network aliphatic polyesters“ *Reactive and functional Polymers* 30, 165-171 (1996)
- Nagata, M., Kiyotsukuri T., Hasegawa T., Tsutsumi N., Sakai W.; „Synthesis and enzymatic degradation of aliphatic polyesters copolymerized with trimesic acid“ *J.M.S.-Pure Appl. Chem.: Part A* 34 (6), 965-973 (1997 a)
- Nagata, M., Ibuki H., Sakai W., Tsutsumi N.; „Synthesis, characterisation and enzymatic degradation of novel regular network aliphatic polyesters based on pentaerythritol“ *Macromolecules* 30, 6525-6530 (1997 b)
- Nagata, M., Okano F., Sakai W., Tsutsumi N.; „Separation and enzymatic degradation of blend films of poly(L-lactic acid) and cellulose“ *Journal of polymer science: Part A* 36, 1861-1864 (1998 a)
- Nagata, M., Machida T., Sakai W., Tsutsumi N.; „Synthesis, characterisation and enzymatic degradation studies on the novel network aliphatic polyesters“ *Macromolecules* 31, 6450-6454 (1998 b)
- Nakayama A., Kawasaki N., Aiba S., Maeda Y., Arvanitoyannis I., Yamamoto N.; „Synthesis and biodegradability of novel copolyesters containing  $\gamma$ -butyrolactone units“ *Polymer* 39, 1213-1222 (1998)
- Nishida H., Tokiwa Y.; „Effects of Higher-Order Structure of Poly(3-hydroxybutyrate) on its Biodegradation. II.Effects of Crystal Structure on Microbial Degradation“ *Journal of Environmental Polymer Degradation* 1 (1), 65-80 (1993)
- Nikolic M., S., Djonlagic J.; „Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s“ *Polymer Degradation and Stability* 74 (2), 263-270 (2001)

- Ou C.-F., Chao M.-S., Huang S.-L.; „The crystallization behaviors of poly(butylene terephthalate) blended with co[poly(butylene terephthalate-p-oxybenzoate)] copolyesters“ European Polymer Journal 36 (12), 2665-2670 (2000)
- Palmisano A.C., Pettigrew C.A.; „Biodegradability of plastics.“ Bioscience 42 (9), 680-685 (1992)
- Parikh M., Gross R.A., McCarthy S.P.; „The effect of crystalline morphology on enzymatic degradation kinetics“ PMSE 66, 408-410 (1992)
- Park C.-S., Lee K.-J., Nam J.-D., Kim S.-W.; „Crystallization kinetics of glass fiber reinforced PBT composites“ Journal of Applied Polymer Science 78 (3), 576-585 (2000)
- Rafler, G.; „Neuere Entwicklungen bei biologisch abbaubaren Kunststoffen“ Spektrum der Wissenschaft 81-84, (1995)
- Righetti M. C., Pizzoli M., Lotti N., Munari A.; „Crystallization kinetics and melting behavior of poly(butylene adipate), poly(butylene isophthalate) and their copolymers“ Macromolecular Chemistry and Physics 199, 2063-2070 (1998)
- Rizarelli P., Montaudo G.; „Role of structure and crystallinity of synthetic aliphatic copolyesters on their enzymatic degradation“ (Poster) The second International Conference on Biopolymer Technology, 25.-27. Oktober, Ischia, Italien (2000)
- Römpp Lexikon Chemie-Version 1.5, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag (1998)
- Rössler A., Skillas G., Pratsins S.E.; „Nanopartikel - Materialien der Zukunft“ Chemie in unserer Zeit 35 (1) 32-41 (2001)
- Rudd E.A., Mizuno N.K., Brockmann H.L.; „Isolation of two forms of carboxylester lipase (cholesterol esterase) from *porcine pancreas*“ Biochim. Biophys. Acta. 918 (2), 106-114 (1987)
- Sakazawa, C., Shimao M., Taniguchi Y., Kato N.; „Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures“ Applied and Environmental Microbiology 41 (1), 261-267 (1981)
- Scandola M., Focarete M. L., Adamus G., Sikorska W., Baranowska I., Swierczek S., Gnatowski M., Kowalczyk M., Jedlinski Z.; „Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies“ Macromolecules 30, 2568-2574 (1997 a)
- Scandola M., Focarete M. L., Gazzano M., Matuszowics A., Sikorska W., Adamus G., Kurcok P., Kowalczyk M., Jedlinski Z.; „Crystallinity -Induced biodegradation of novel [(R,S)- $\beta$ -butyrolactone]- $\epsilon$ -pivalolactone copolymers“ Macromolecules 30, 7743-7748 (1997 b)

- Scatena M., Sanmartin P., Zilio-Grandi F.; Proceedings of the IXth FATIPEC Congress, Brussels, Sec 3, 68 (1968)
- Schlegel H.B.; „Allgemeine Mikrobiologie“ Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1985)
- Schmid R. D., Verger R.; „Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications“ Angewandte Chemie International Edition 37, 1608-1633 (1998)
- Schultz J. M.; „Effect of Specimen Thickness on Crystallization Rate“ Macromolecules 29 (8), 3022-3024 (1996)
- Shimao M.; „Biodegradation of plastics“ Current opinion in Biotechnology 12 (3), 242-247 (2001)
- Seretoudi G., Bikiaris D., Panayiotou C.; „Synthesis, characterization and biodegradability of poly(ethylene succinate)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) block copolymers“ Polymer 43, 5405-5415 (2002)
- Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E.; „Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices“ Journal of Controlled Release 70, 1-20 (2001)
- Stapert H.R.; „Environmentally degradable polyesters, poly(ester-amides) and poly(ester-urethanes)“ Dissertation der Universität Twente (1998)
- Suyama T., Tokiwa Y.; „Enzymatic degradation of an aliphatic polycarbonate, poly(teramethylene carbonate)“ Enzyme and Microbial Technology 20, 122-126 (1997)
- Sykes P.; „Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie“ 9. Auflage, VCH Weinheim (1988)
- Tieke B.; „Makromolekulare Chemie: Eine Einführung“ VCH, Weinheim (1997)
- Toida J., Arikawa Y., Kondou K., Fukuzawa M., Sekiguchi J.; „Purification and characterization of triglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*“ Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 62 (4), 759-763 (1998)
- Tonford C.; „Physical Chemistry of Macromolecules“ Wiley, New-York (1961)
- Tokiwa Y., Suzuki T.; „Purification and Some Properties of Polyethylene Adipate-degrading Enzyme Produced by *Penicillium* sp. Strain 14-3“ Agric. Biol. Chem. 41(2), 265-274 (1977 a)
- Tokiwa, Y., Suzuki T.; „Hydrolysis of polyesters by lipase“ Nature 270, 76-78 (1977 b)

- Tokiwa, Y., Suzuki T.; „Hydrolysis of polyesters by *Rhizopus delemar* lipase" Agric. Biol. Chem. 42(5), 1071-1072 (1978)
- Tokiwa, Y., Suzuki T.; „Hydrolysis of copolyesters containing aromatic and aliphatic ester blocks by lipase" J. Appl. Polym. Sci. 26, 441-448 (1981)
- Tokiwa, Y., Suzuki T., Takeda K.; „Two types of lipases in hydrolysis of polyester" Agric. Biol. Chem. 52 (8), 1937-1943 (1988)
- Tokiwa Y., Ando T., Suzuki T., Takeda T.; „Biodegradation of synthetic polymers containing ester bonds" Polym. Mater. Sci. Eng. 62, 988-992 (1990)
- Tsuji H., Miyauchi S.; „Poly(L-lactide): VI Effects of crystallinity on enzymatic hydrolysis of poly(L-lactide) without free amorphous region" Polymer Degradation and Stability 71, 415-424 (2001)
- Van der Zee, M. „Structure-biodegradability relationships of polymeric materials" Dissertation University of Twente, Kapitel 7, Enschede, Netherlands, 91-108 (1997)
- Van Krevelen D.W.; „Properties of Polymers: Their correlation with chemical structure, their numerical estimation and prediction from additive group distribution" Elsevier, 3. Auflage, New York (1990)
- Vergler R., de Haas G. H.; „Interfacial enzyme kinetics of lipolysis" Annu. Rev. Biophys. Bioeng 5, 77-117 (1976)
- Voet D., Voet J.; „Biochemie", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992)
- Vollmert B.; „Grundriss der Makromolekularen Chemie, Band I-V" E. Vollmert-Verlag, Karlsruhe, (1998)
- Walter T., Augusta J., Müller R.-J., Widdecke H., Klein J.; „Enzymatic degradation of a model polyester by lipase from *Rhizopus delemar*" Enzyme and Microbial Technology 17,218-224, (1995)
- Walter A.; „Untersuchungen zur Korrelation von Lipase-Adsorption und enzymatischem Abbau an aliphatischen Polyestern" Diplomarbeit der Technischen Universität Braunschweig (1996)
- Wang L., Ma W., Gross R.A., McCarthy S.P.; „Reactive compatibilization of biodegradable blends of PLA and PCL" Polymer Degradation and Stability 59, 161-168 (1998)
- Wang X., Zhou W.; „Glass Transition of Microtome-Sliced Thin Films" Macromolecules 35, 6747-6750 (2002)

- Wedler G.; „Lehrbuch der Physikalischen Chemie“ dritte, durchgesehene Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1987)
- Welzel, K.; „Untersuchungen zum biologischen Abbau von Polyestern in dreidimensionalen Netzwerken“ Diplomarbeit der Technischen Universität Braunschweig (1999)
- Witt U., Müller R.-J., Deckwer W.-D.; „New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties.“ *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3 (4), 215-223 (1995)
- Witt U.; „Synthese, Charakterisierung und Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit von anwendungsorientierten biologisch abbaubaren aliphatisch/aromatischen Copolyestern“ Dissertation der Technischen Universität Braunschweig (1996)
- Witt U., Müller R.-J., Klein J.; „Biologisch abbaubare Polymere: Status und Perspektiven.“ Franz-Patatz-Zentrum, Braunschweig (1997)
- Witt U., Yamamoto M., Seeliger U., Müller R.-J., Warzelhan V.; „Biodegradable polymeric materials - not the origin but the chemical structure determines biodegradability.“ *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (10), 1438-1442 (1999)
- Witt U., Einig T., Yamamoto M., Kleeberg I., Deckwer W.-D., Müller R.-J.; „Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates“ *Chemosphere* 44 (2), 289-299 (2001)
- Wu C., Gan Z.; „A novel method of studying polymer biodegradation“ *Polymer* 39 (18), 4429-4431 (1998)
- Yamamoto, M.; mündliche Mitteilung (2002)
- Yoo E.S., Im S.S.; „Effect of Crystalline and Amorphous Structures on Biodegradability of Poly(Tetramethylene Succinate)“ *Journal of Environmental Polymer Degradation* 7 (1), 19-26 (1999)
- Zhao Y., Hu T., Lv Z., Wang S, Wu C.; „Laser Light-Scattering Studies of Poly(caprolactone-b-ethylene oxide-b-caprolactone) Nanoparticles and Their Enzymatic Biodegradation“ *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 37, 3288-3293 (1999)



## 8 Anhang

### Berechnung der Oberfläche der Nanopartikel

$$A_i(d_{pi}) = \pi d_{pi}^2$$

Gleichung 8-1

$A_i(d_{pi})$  = Oberfläche eines Partikels i mit dem Durchmesser  $d_{pi}$  [ $\text{cm}^2$ ]

$d_{pi}$  = Durchmessers des Partikels i [cm]

Annahme einer monodispersen Partikelgrößenverteilung:  $d_{pi} = d_p$

$$A = N_p \pi d_p^2 = \frac{m_t}{m_p} \pi d_p^2$$

Gleichung 8-2

$A$  = Gesamtoberfläche [ $\text{cm}^2$ ]

$N_p$  = Anzahl der Partikel [mol]

$m_t$  = Gesamtmasse der Nanopartikel [g]

$m_p$  = Masse eines Nanopartikels [g]

Die Masse eines Nanopartikels ( $m_p$ ) lässt sich mittels der Dichte ( $\rho_p$ ) berechnen

$$m_p = \rho_p V_p = \rho_p \frac{1}{6} \pi d_p^3$$

Gleichung 8-3

$\rho_p$  = Dichte = 1,3 g  $\text{cm}^{-3}$

$V_p$  = Volumen eines Partikels [ $\text{cm}^3$ ]

Die Gesamtoberfläche lässt sich durch Einsetzen von Gleichung 8-3 in Gleichung 8-2 folglich nach Gleichung 8-4 berechnen

$$A = \frac{m_t}{\rho_p} \cdot \frac{6}{d_p}$$

Gleichung 8-4

Tabelle 8-1: spezifische Aktivität der Lipasen und deren Abbaurate gegenüber zwei SP 4/6-Filmen ( $\varnothing=0,9$  cm) und SP 4/6-Nanopartikeln ( $\varnothing=200$  nm)

Lipase	Triglyceriden	SP 4/6-Filme		SP 4/6-Nanopartikel	
	Aktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ $\text{mg}_{\text{Protein}}^{-1}$ ]	Abbaurate [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ ]	ES <sup>b)</sup> [%]	Abbaurate <sup>a)</sup> [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}_{\text{Protein}}$ ]	ES <sup>b)</sup> [%]
Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i> (AoL)	3,4	0,14	40	2,87	25
Lipase aus <i>Candida antartica</i> (CaL)	0,3	0,01	- <sup>c)</sup>	2,86	55
Lipase aus <i>Candida cylindracea</i> (CcL)(= <i>Candida rugosa</i> )	20	0,01	- <sup>c)</sup>	0,90	42
Lipase aus <i>Mucor miehei</i> (MmL)	2,2	0,04	40	1,56	26
Lipase aus <i>Porcine pancreas</i> (PpL)	3,6	0,01	- <sup>c)</sup>	3,6	30
Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i> (PcL)	60	0,21	- <sup>c)</sup>	2,7	22
Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PfL)	370	0,39	- <sup>c)</sup>	3,42	26
Lipase aus <i>Pseudomonas species</i> (PsL)	190	0,42	40	4,68	38
Proteinase K	0,5	0	- <sup>c)</sup>	0,06	- <sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> die Oberfläche ist wahrscheinlich nicht vollständig mit Enzym belegt.

<sup>b)</sup> ES: Esterspaltung in % bei Erreichen des Plateaus.

<sup>c)</sup> es wurde kein Plateau erreicht.



Abb. 8-1:

Enzymaktivität der Lipasen aus *Candida cylindracea* (Substrat: Triolein und Triacetin) und *Pseudomonas species* (Substrat: Adipinsäuredibutylester) in Abhängigkeit von der Messtemperatur. (Die Werte für PsL aus MARTEN 2000)

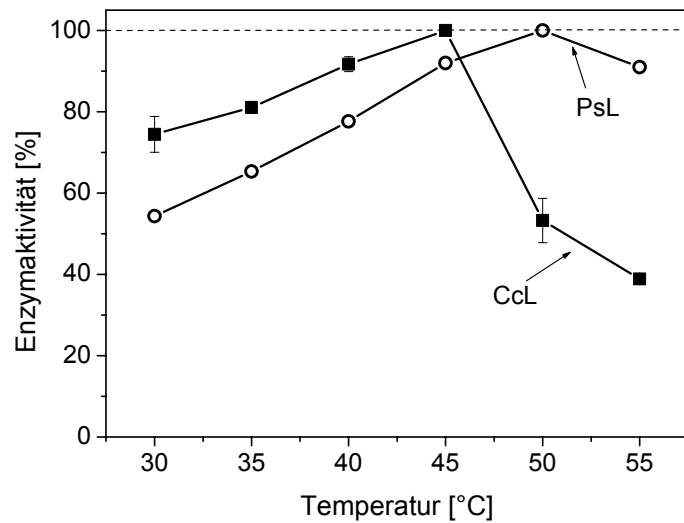


Abb. 8-2:

Verringerung der Enzymaktivität der Lipasen aus *Candida cylindracea* (Substrat: Triolein und Triacetin) und *Pseudomonas species* (Substrat: Adipinsäuredibutylester) unter Schütteln bei 900 U min<sup>-1</sup> (30°C, 50°C) bei verschiedenen Lagerzeiten. (Die Werte für PsL aus MARTEN 2000)

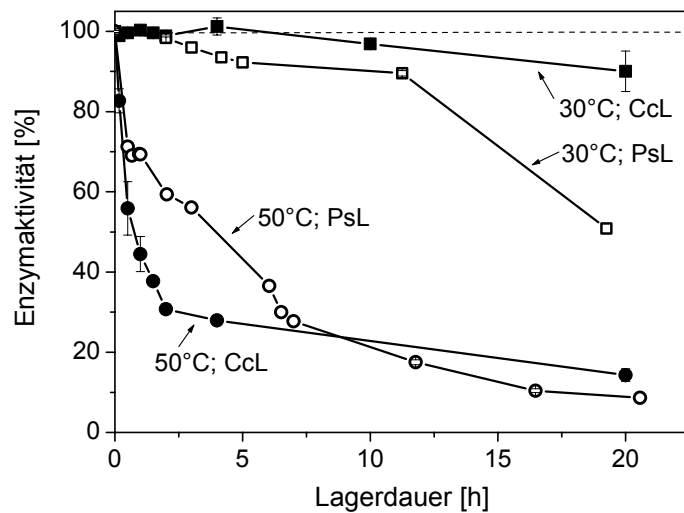
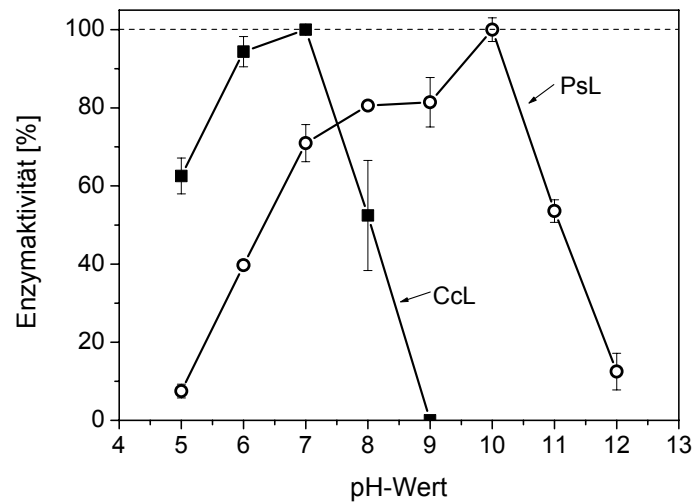
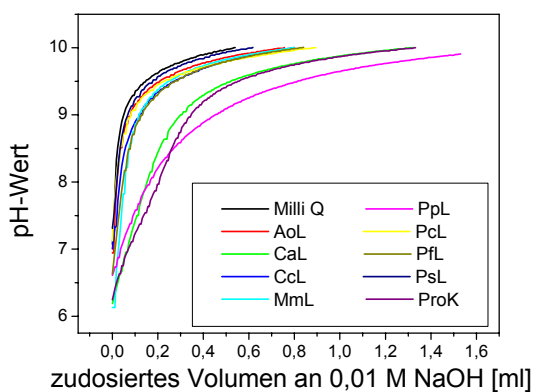


Abb. 8-3:

Enzymaktivität der Lipasen aus *Candida cylindracea* (Substrat: Triolein und Triacetin bei 40°C) und *Pseudomonas species* (Substrat: Adipinsäuredibutylester bei 37°C) in Abhängigkeit vom pH-Wert. (Die Werte für PsL aus MARTEN 2000)



a) titriert mit 0,01 M NaOH



b) titriert mit 0,01 M HCl

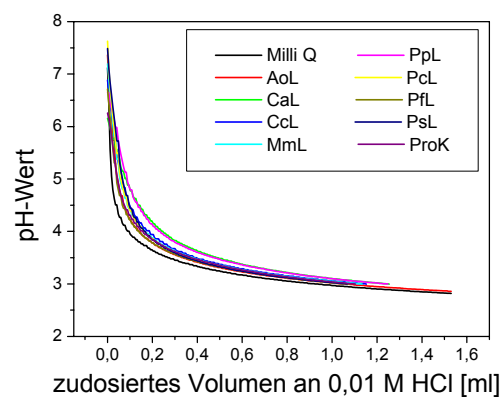


Abb. 8-4: Pufferwirkung der Enzymlösungen (MilliQ : bidestilliertes Wasser, AoL: Lipase aus *Aspergillus oryzae*, CaL: Lipase aus *Candida antarctica*, CcL: Lipase aus *Candida cylindracea*, MmL: Lipase aus *Mucor miehei*, PpL: Lipase aus *Porcine pancreas*, PcL: Lipase aus *Pseudomonas cepacia*, PfL: Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*, PsL: Lipase aus *Pseudomonas species*, ProK: Proteinase K)

Abb. 8-5:

Abbau einer SP 4/6-Suspension (unterschiedliche Massen) mit der Lipase aus *Aspergillus oryzae* (1 mg Protein pro Ansatz) bei 40°C und pH7,0.

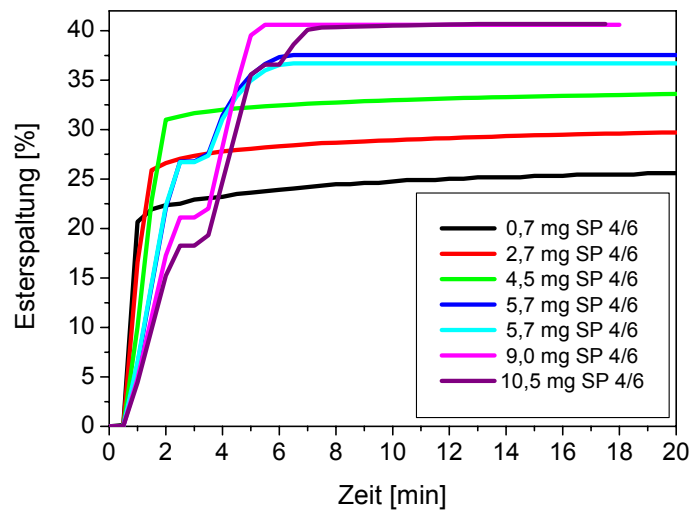
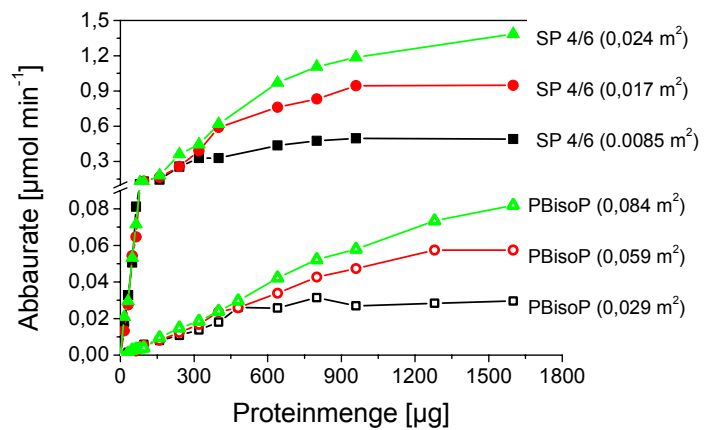
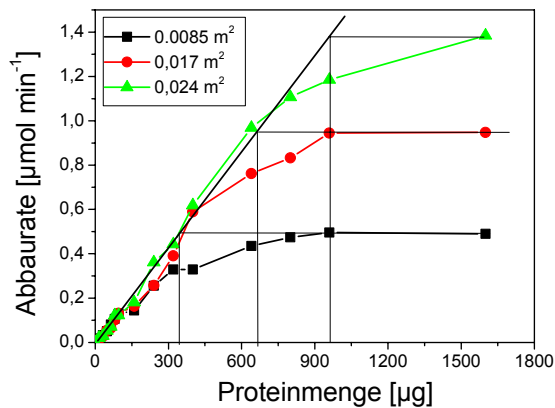


Abb. 8-6:

Abhängigkeit der Abbaurates von SP 4/6-Nanopartikeln ( $\varnothing=190$  nm) und PBI-Nanopartikeln ( $\varnothing=55$  nm) von der zugesetzten Proteinmenge der Lipase aus *Candida cylindracea* bei 40°C.



a) SP 4/6



b) PBI

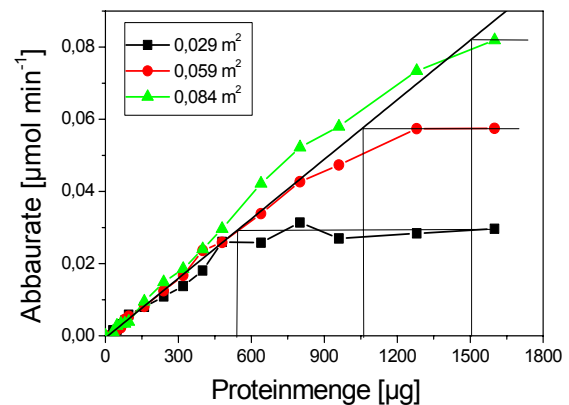


Abb. 8-7: Bestimmung der zudosierten Proteinmenge der Lipase aus *Candida cylindracea*, die zur maximalen Belegung der a) SP 4/6-Oberfläche und b) PBI-Oberfläche notwendig ist (40°C, pH 7,0).

Berechnung der theoretisch benötigten Proteinmenge der Lipase aus *Candida cylindracea* zur vollständigen Belegung der Polymeroberfläche

Die Lipase aus *Candida cylindracea* besitzt ein Molekulargewicht von 67000 g mol<sup>-1</sup>. Daraus ergibt sich nach TONFORD (1961) nach Gleichung 5-30

$$R = 0,72 \cdot M^{\frac{1}{3}}$$

Gleichung 8-5

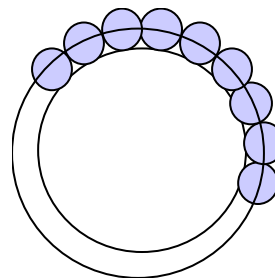
R= Radius eines globulären Proteins [Å]  
M= Molekulargewicht [g mol<sup>-1</sup>]

ein Durchmesser von 60 Å bzw. 6 nm.

Dem Enzym steht eine Oberfläche zur Verfügung, die der Summe aus Polymerpartikel- und Enzymdurchmesser entspricht.

Abb. 8-8:

Gesamtoberfläche, die mit Enzym belegt werden kann.



Diese Gesamtoberfläche berechnet sich nach Gleichung 8-6

$$A = \pi(d_p + d_E)^2$$

Gleichung 8-6

A= zu belegende Oberfläche eines Partikels [nm<sup>2</sup>]

d<sub>p</sub>= Durchmesser des Partikels [nm]

d<sub>E</sub>= Durchmesser des Enzyms [nm]

Die Anzahl der Enzymmoleküle, die notwendig sind, um die Oberfläche eines Partikels zu belegen ergibt sich aus Gleichung 8-7.

$$n_E = \frac{A}{A_E} = \frac{A}{d_E^2}$$

Gleichung 8-7

n<sub>E</sub>= Anzahl der Enzyme

A<sub>E</sub>= Oberfläche eines Enzymmoleküls [nm<sup>2</sup>]

Die daraus resultierende Masse an Enzym liefert Gleichung 8-8.

$$m_E = \frac{n_E \cdot M_E}{N_A}$$

Gleichung 8-8

m<sub>E</sub>= Masse an Enzym [g]

M<sub>E</sub>= Molekulargewicht des Enzyms [g mol<sup>-1</sup>]

N<sub>A</sub>= Avogadro-Konstante [mol<sup>-1</sup>]

Da aber nicht die gesamte Enzymmenge der Lipase aus *Candida cylindracea* auch aktivem Protein entspricht, ist eine Division der berechneten Masse des Enzym durch den Proteingehalt notwendig.

$$m_{EP} = \frac{m_E \cdot 100}{PG}$$

Gleichung 8-9

m<sub>EP</sub>= Masse an Enzym bei einem Proteingehalt ≠100% [g]

PG= Proteingehalt des Enzyms (CcL=40%) [%]

Die nach Gleichung 8-9 berechnete Enzymmenge wird benötigt, um ein Polymernanopartikel vollständig zu belegen. Um die Gesamtmasse an Enzym zur Belegung der Oberfläche aller vorhandenen Polymerpartikel berechnen zu können, ist eine Kenntnis der Anzahl dieser Partikel notwendig.

$$n_{pt} = \frac{m_t}{m_{pi}} = \frac{m_t}{\rho_p V_p} = \frac{6m_t}{\rho_p \pi d^3}$$

Gleichung 8-10

 $n_{pt}$ = Anzahl aller eingesetzten Polymerpartikel $m_t$ = Gesamtmasse aller eingesetzten Partikel [g] $m_{pi}$ = Masse eines Partikels [g] $\rho_p$ = Dichte= 1,3 g cm<sup>-3</sup> $V_p$ = Volumen eines Partikels [cm<sup>3</sup>] $d_p$ = Durchmesser eines Partikels [cm]

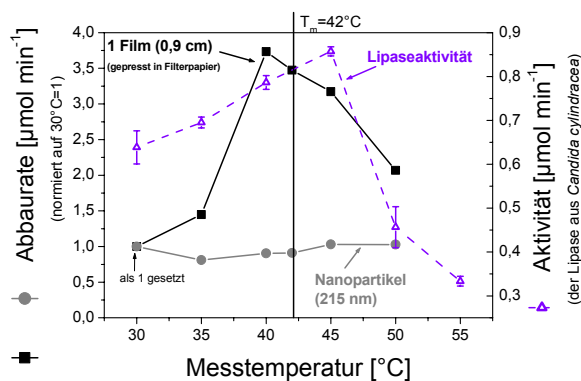
Die Masse an Enzym, die notwendig ist, um  $n_{pt}$  Polymerpartikel vollständig zu belegen, ergibt sich aus Gleichung 8-11.

$$m_{Et} = m_{EP} \cdot m_{pt}$$

Gleichung 8-11

 $m_{Et}$ = Gesamtmasse an Enzym [g]

a)



b)

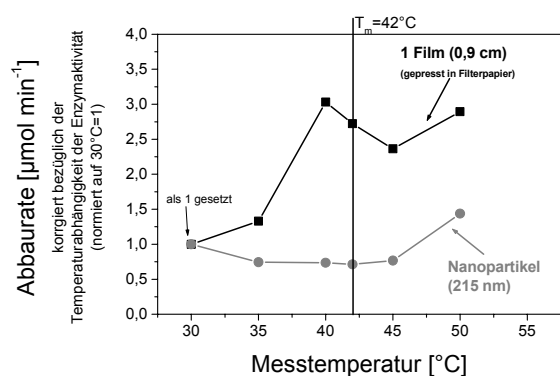


Abb. 8-9: Abhängigkeit der Abbaureate von SP 3/6-Filmen (eingepresst in Filterpapier, um eine Veränderung der Oberfläche beim Schmelzen des Polyesters zu verhindern,  $\varnothing=0,9$  cm) und SP 3/6-Nanopartikeln ( $\varnothing=215$  nm) von der Messtemperatur für a) normierte Abbaureaten: Abbaureate bei  $T=30^\circ\text{C}$  als 1 gesetzt. b) auf die Enzymaktivität korrigierten Werte (s. Kapitel 4.9), normierte Abbaureaten: Abbaureate bei  $T=30^\circ\text{C}$  als 1 gesetzt. (Lipase aus *Candida cylindracea*, pH 7,0)

Bestimmung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\left(\frac{E_A}{RT}\right)}$$

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_A}{RT}\right)$$

R: Gaskonstante= 8,3143 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>

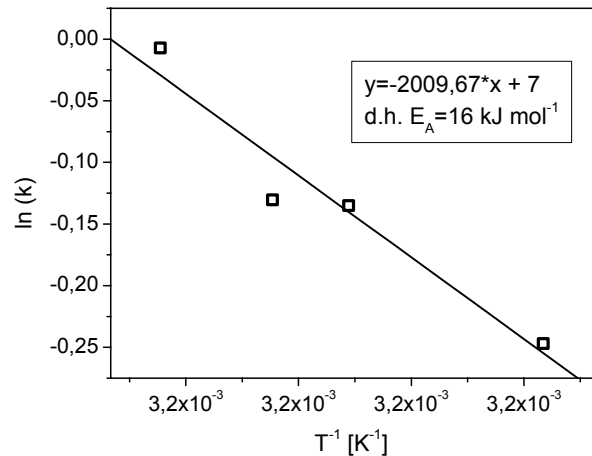


Abb. 8-10: Bestimmung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius am Beispiel des Abbaus von SP 3/6-Nanopartikeln mit der Lipase aus *Candida cylindracea*

Abb. 8-11:

Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit (korrigiert nach Gleichung 4-12 in Kapitel 4.9) von Nanopartikeln aliphatischer Homopolyester (SP 4/x) von der Messtemperatur (Lipase aus *Candida cylindracea*, pH 7,0)

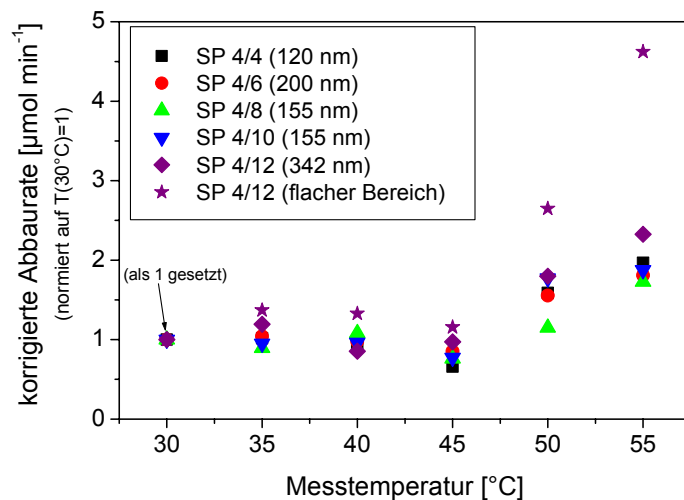
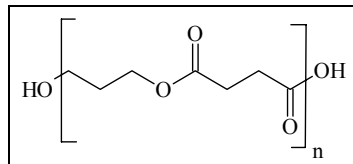


Tabelle 8-2: Beitrag verschiedener chemischer Strukturen zur Schmelzenthalpie [VAN KREVELEN 1990]

Gruppe	Beitrag zu $\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]
	17
-COO-	-2,5
-CH <sub>2</sub> -	4

Beispielrechnungen nach VAN KREVELEN (1990):

a) SP 3/4:



$$M_{\text{rep}} = 158,17 \text{ g mol}^{-1}$$

Gruppe	Anzahl	Beitrag zu $\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Summe [kJ mol <sup>-1</sup> ]
-CH <sub>2</sub> -	5	4	20
-COO-	2	-2,5	-5
Summe			15

Umrechnen der Schmelzenthalpie von [kJ mol<sup>-1</sup>] in [J g<sup>-1</sup>] nach Gleichung 8-12:

$$\Delta H_m^0(2) = \frac{\Delta H_m^0(1) \cdot 1000}{M_{\text{rep}}}$$

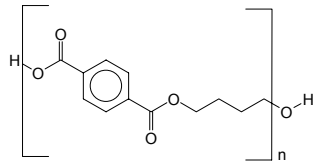
Gleichung 8-12

 $\Delta H_m^0(1)$ = Schmelzenthalpie [kJ mol<sup>-1</sup>] $\Delta H_m^0(2)$ = Schmelzenthalpie [J g<sup>-1</sup>] $M_{\text{rep}}$ = Molekulargewicht einer Repetiereinheit [g mol<sup>-1</sup>]

$$\Delta H_m^0 = 15 \text{ kJ mol}^{-1} = 94,8 \text{ J g}^{-1}$$



a) PBT:



$$M_{\text{rep}} = 220,24 \text{ g mol}^{-1}$$

Gruppe	Anzahl	Beitrag zu $\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Summe [kJ mol <sup>-1</sup> ]
	1	17	17
-CH <sub>2</sub> -	4	4	16
Summe			33

$$\Delta H_m^0 = 33 \text{ kJ mol}^{-1} = 149,8 \text{ J g}^{-1}$$

Tabelle 8-3: Vergleich der Versuchsbedingungen des enzymatischen Abbaus, die im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurden (eigene Versuche) und die von RIZARELLI und MONTAUDO (2000) angewandten Methoden.

	Eigene Versuche	RIZARELLI (2000)
Abbau	Esterspaltung [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]	Masseverlust [ $\text{mg cm}^{-2}$ ]
Temperatur	40°C	37°C
Lipase	Lipase aus <i>Canida cylindracea</i>	Lipase aus <i>Mucor meihei</i>
Lipasemenge	4 mg ml <sup>-1</sup> , 250 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ , k.A.
pH-Wert	7,0	7,4
Eingesetzte Oberfläche	2 Filme ( $\varnothing=0,9 \text{ cm}$ ) A= 2,6 cm <sup>2</sup>	Filme (20*7,5 mm <sup>2</sup> ) A= 3 cm <sup>2</sup>
Eingesetzte Masse an Polymer	20 mg	20-30 mg

k.A.: keine Angaben

Abb. 8-12:

Vergleich der nach Tabelle 8-3 gemessenen Abbauraten der aliphatischen Copolyester aus 1,4-Butandiol, Adipinsäure und Bernsteinsäure (BASu x:y)

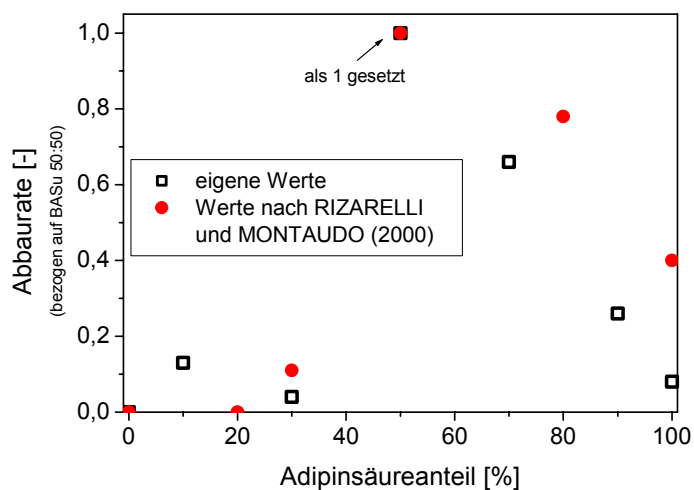
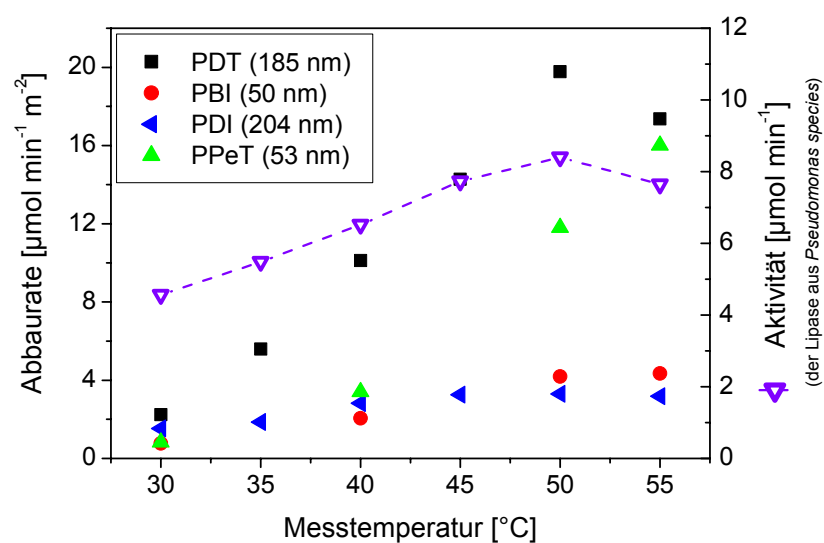


Tabelle 8-4: Die maximal erreichten Esterspaltungen und die daraus resultierende Größe der wasserlöslichen Oligomere

Polyester	Maximale Esterspaltung [%]	Mittlere Anzahl an Esterbindungen pro Oligomer
PPeT	40	1,5
PDT	20	4
PDI	30	2,3
PBI	30	2,3

a)



b)

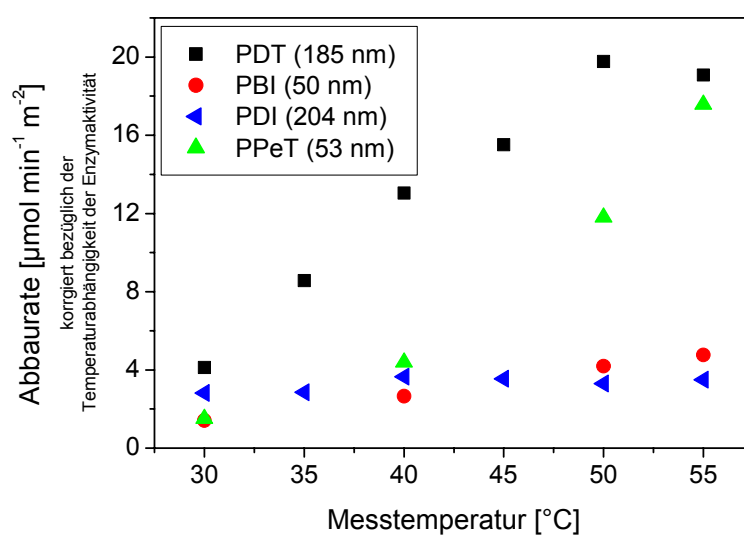


Abb. 8-13: Abhängigkeit der Abbaureate Nanopartikel aromatischer Homopolyester von der Messtemperatur (Lipase aus *Pseudomonas species*) a) gemessene Abbauraten; b) bezüglich der Enzymaktivität korrigierte Abbauraten (s. Kapitel 4.9).

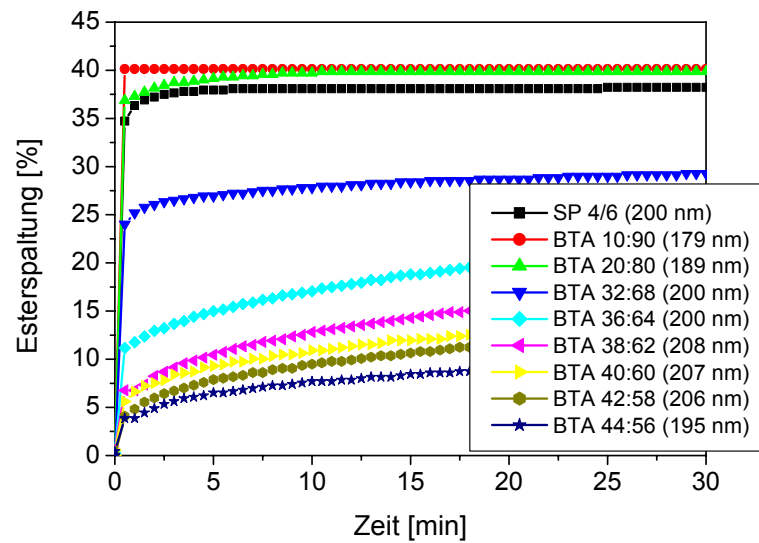


Abb. 8-14: Abhängigkeit der Höhe der ersten Stufe von der stöchiometrischen Zusammensetzung der BTA-Copolyester (Lipase aus *Pseudomonas species*, 40°C). Zu berücksichtigen ist, dass nach 30 Minuten enzymatischen Abbaus bei den Copolyestern BTA 32:68, BTA 36:64, BTA 38:62, BTA 40:60, BTA 42:58 und BTA 44:56 noch Partikel vorhanden sind. Die maximal erreichbare Esterspaltung beträgt für z.B. BTA 40:60 ca. 50% und wird erst nach ca. 40 Stunden erreicht.

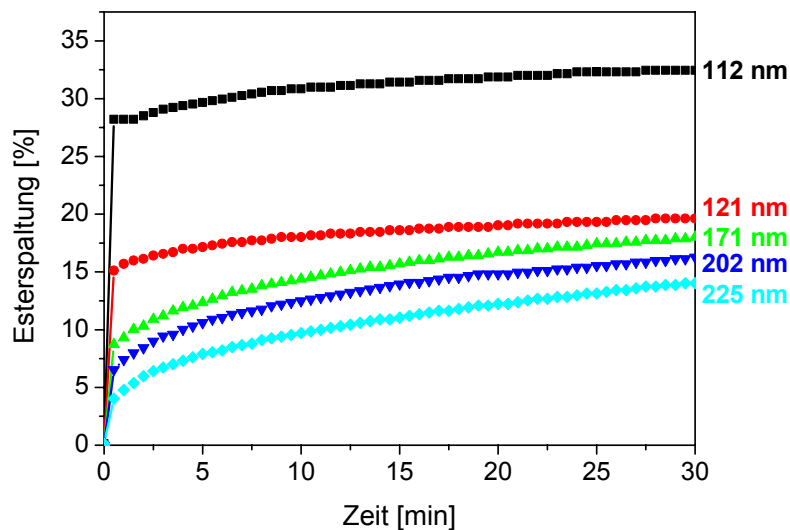


Abb. 8-15: Einfluss des Partikeldurchmessers der Nanopartikel des BTA 40:60 ( $m=0,7$  mg) auf die Höhe der ersten Stufe der Abbaukurve (Lipase aus *Pseudomonas species*, 40°C).

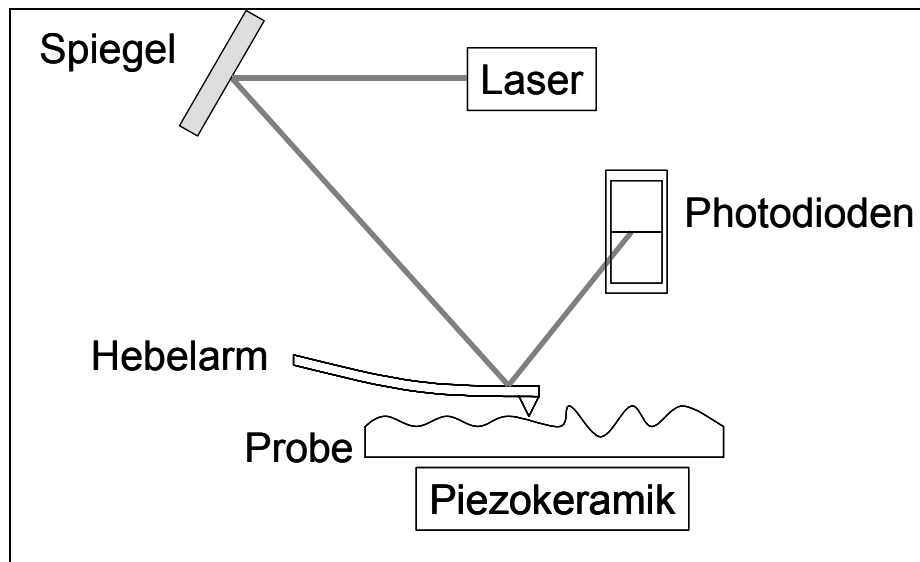


Abb. 8-16: Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops. Die Rasterkraftmikroskopie misst die Kräfte, die zwischen der verwendeten Sonde und der Oberfläche der Probe herrschen. Die Oberfläche der Probe wird mit einer feinen Nadel, die sich am freien Ende eines Hebelarms (Cantilever) befindet, rasterförmig abgetastet. Beim Rastern wird die Probe durch eine xyz-Piezokeramik bewegt, während die Tastspitze fixiert ist. Die Auslenkung des Hebelarms dient als Messsignal und wird optisch detektiert: Ein Laserstrahl wird auf das freie Ende des Hebelarms justiert und der reflektierte Strahl über eine Photodiode ortsauflösend detektiert. Durch Darstellung des Messsignals als Funktion der x-y-Position der Rasterbewegung wird ein dreidimensionales Bild erzeugt.

Abb. 8-17:

Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten von Esterbindungen in Nanopartikeln aliphatischer (PDA: polykondensiert aus Diethylenglykol und Adipinsäure) und aromatischer Homopolyester (PDI: polykondensiert aus Diethylenglykol und Iso-phthalsäure). Diese Polyester sind vollständig amorph. (Lipase aus *Pseudomonas species*, 40°C)

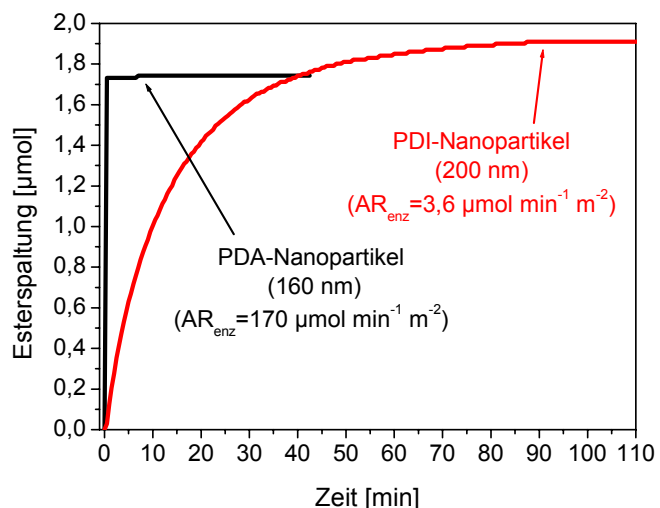


Abb. 8-18:

Bindungslängen und Bindungswinkel von organischen Verbindungen [SYKES 1988].

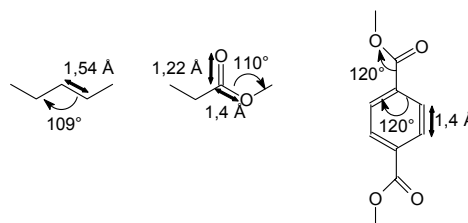


Abb. 8-19:

Berechnung der Länge einer Repetiereinheit des Copolyesters BTA<sub>altern.</sub> 50:50.

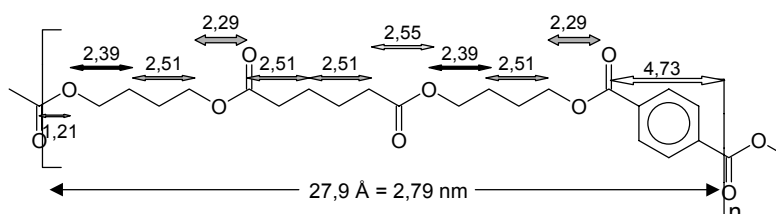
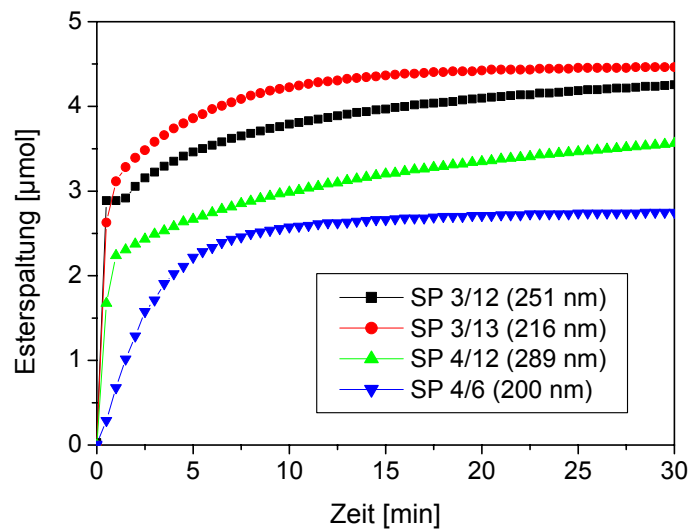


Tabelle 8-5: Abbauraten von Nanopartikeln aliphatischer Homopolyester und der in Toluol gelösten Polyester

Polyester	Abbauraten der Nanopartikel im Enzymüberschuss [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{m}^{-2}$ ]	Abbauraten der Nanopartikel im Enzymunterschuss [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]	Abbauraten der gelösten Polyester [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]
SP 3/4	95	$14,07 \cdot 10^{-2}$	$2,15 \cdot 10^{-2}$
SP 3/6	74	$20,86 \cdot 10^{-2}$	$3,70 \cdot 10^{-2}$
SP 3/9	554	$196,26 \cdot 10^{-2}$	$15,06 \cdot 10^{-2}$
SP 3/10	271	$82,62 \cdot 10^{-2}$	$9,11 \cdot 10^{-2}$
SP 3/12	444	$135,37 \cdot 10^{-2}$	$13,96 \cdot 10^{-2}$
SP 3/13	370	$167,23 \cdot 10^{-2}$	$4,16 \cdot 10^{-2}$
SP 4/4	77	$18,72 \cdot 10^{-2}$	n.d <sup>a)</sup> .
SP 4/6	55	$15,98 \cdot 10^{-2}$	$1,69 \cdot 10^{-2}$
SP 4/8	165	$52,19 \cdot 10^{-2}$	$5,39 \cdot 10^{-2}$
SP 4/10	181	$61,63 \cdot 10^{-2}$	$5,04 \cdot 10^{-2}$
SP 4/12	301	$79,66 \cdot 10^{-2}$	$4,28 \cdot 10^{-2}$
SP 5/6	48	$24,79 \cdot 10^{-2}$	$0,94 \cdot 10^{-2}$
SP 5/7	80	$30,49 \cdot 10^{-2}$	$2,40 \cdot 10^{-2}$
SP 6/4	46	$7,90 \cdot 10^{-2}$	$2,09 \cdot 10^{-2}$
SP 6/6	43	$9,51 \cdot 10^{-2}$	$0,43 \cdot 10^{-2}$
PCL	40	$9,41 \cdot 10^{-2}$	$0,66 \cdot 10^{-2}$

Abb. 8-20:

Abbaukurven von SP 4/12-, SP 3/12- und SP 3/13-Nanopartikeln im Vergleich zur Abbaukurve der SP 4/6-Nanopartikel (Lipase aus *Candida cylindracea*, 40°C)



### Berechnung von $\rho_{EB}$

Die Dichte der Esterbindungen pro Volumen Polymer lässt sich anhand von Gleichung 8-13 berechnen. Für die Dichte wurde, wie in Kapitel 4.6.2 zur Berechnung der Oberflächen der Polymernanopartikel, ein Wert von  $\rho_p = 1,3 \text{ g cm}^{-3}$  angenommen.

$$\rho_{EB} = \frac{n_{EB / Mrep}}{M_{Rep}} \rho_p$$

Gleichung 8-13

$\rho_{EB}$  = Dichte der Esterbindungen [ $\text{mol cm}_{\text{solid}}^{-3}$ ]

$n_{EB/Mrep}$  = Anzahl der Esterbindungen pro Repetiereinheit

$M_{Rep}$  = Molmasse einer Repetiereinheit [ $\text{g mol}^{-1}$ ]

$\rho_p$  = Dichte des Polymeren =  $1,3 \text{ g cm}^{-3}$

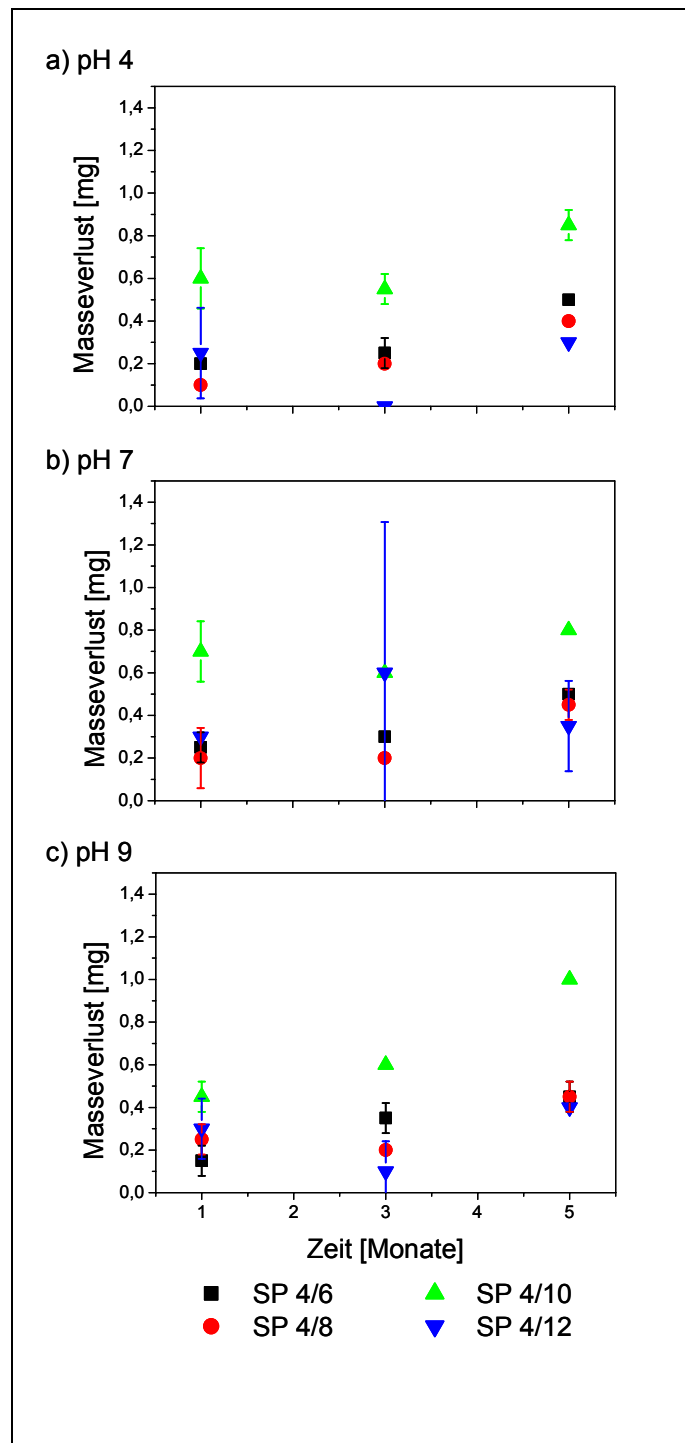
Tabelle 8-6: Dichte der Esterbindungen verschiedener aliphatischer Homopolyester

Polymer	$M_{\text{Rep}}$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$n_{\text{EB}}/M_{\text{rep}}$	Gehalt an Esterbindungen [mmol g <sup>-1</sup> ]	$\rho_{\text{EB}}$ [μmol cm <sub>solid</sub> <sup>-1</sup> ]
SP 3/4	158,17	2	12,64	16,44
SP 3/6	186,23	2	10,74	13,96
SP 3/9	216,31	2	9,25	12,02
SP 3/10	242,35	2	8,25	10,73
SP 3/12	270,41	2	7,40	9,62
SP 3/13	284,44	2	7,03	9,14
SP4/4	172,2	2	11,61	15,10
SP 4/6	200,26	2	9,99	12,98
SP 4/8	228,32	2	8,76	11,39
SP 4/10	256,38	2	7,80	10,14
SP 4/12	284,44	2	7,03	9,14
SP 5/6	214,29	2	9,33	12,13
SP 5/7	228,32	2	8,76	11,39
SP 6/4	200,26	2	9,99	12,98
SP 6/6	228,32	2	8,76	11,39
PCL	114,16	1	8,76	11,39



Abb. 8-21:

Hydrolyse von Filmen  
( $\varnothing=1,8$  cm,  $A=5,09$  cm<sup>2</sup>,  
 $m(1 \text{ Film})=130$  mg)  
aliphatischer  
Homopolyester (SP 4/x) bei  
20° bei pH 4, pH 7 und pH  
9 (Puffer).



### Berechnung der Glastemperaturen von Copolyestern

Die Glastemperaturen von Copolyestern lassen sich nach LOTTI et al. (2002) nach Gleichung 8-14 berechnen:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_I}{T_{gI}} + \frac{w_{II}}{T_{gII}}$$

Gleichung 8-14

$T_g$  = Glastemperatur des Copolyesters

$w_I$  = Gewichtsfraktion des Comonomeren I

$T_{gI}$  = Glastemperatur des Comonomeren I

$w_{II}$  = Gewichtsfraktion des Comonomeren II

$T_{gII}$  = Glastemperatur des Comonomeren II

Tabelle 8-7: gemessenen und nach Gleichung 8-14 berechnete Glastemperaturen verschiedener Copolyester (DIA x:y: Diethylenglykol, Isophthalsäure und Adipinsäure; BIA x:y: 1,4-Butandiol, Isophthalsäure und Adipinsäure)

Polyester	$T_g$ [°C] gemessen mittels DSC	$T_g$ [°C] berechnet nach Gleichung 8-14
PDA	-47.3	-47,3
DIA 20:80	-38	-37,7
DIA 40:60	-30.5	-27,3
DIA 60:40	-15.9	-15,8
DIA 80:20	-5.7	-3,3
PDI	10.5	10,5
SP 4/6	-57	-57
BIA 20:80	-51	-45,4
BIA 40:60	-38	-32,5
BIA 60:40	-17	-18
BIA 80:20	-1	-1,8
PBI	16.7	16,7

Abb. 8-22:

Abbau von PHB-Nanopartikeln ( $\varnothing=199$  nm) mit der Lipase aus *Pseudomonas species* und der Lipase aus *Candida cylindracea* bei 40°C und pH 7,0

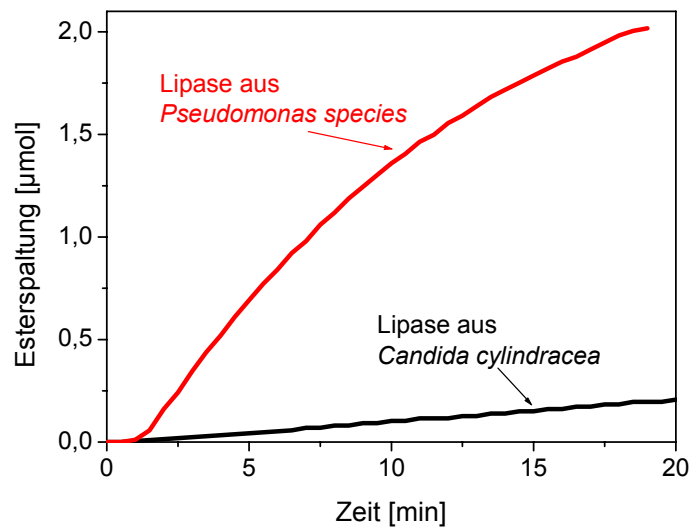
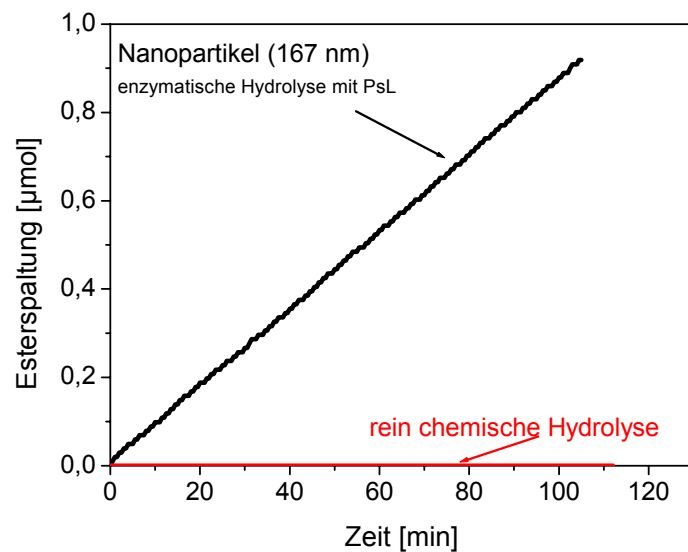


Abb. 8-23:

Abbau von PLA-Nanopartikeln ( $\varnothing=167$  nm) mit der Lipase aus *Pseudomonas species* bei 40°C und pH 7,0





# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Katharina Welzel

geboren am 08.06.1974 in Vechta

Familienstand: ledig

## Ausbildung

1980 - 1984	Grundschule in Damme
1984 - 1986	Orientierungsstufe in Damme
1986 - 1993	Gymnasium in Damme
12.05.1993	Abitur
1993 - 1999	Studium der Chemie an der Technischen Universität in Braunschweig (Abschluss: Diplom-Chemikerin)
16.04.1996	Vordiplom
30.06.1999	Diplom (Thema der Diplomarbeit: „Biologische Abbaubarkeit von Polymeren in dreidimensionalen Netzwerken“)

## Promotion

1999-2003	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig
-----------	--